

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

STUDIJNÍ PROGRAM: BIOCHEMIE
STUDIJNÍ OBOR: BIOCHEMIE



LENKA PACHOLÍKOVÁ

**Vývoj terapeutického prostředku pro pasivní imunizaci
nemocných cystickou fibrózou**

**Development of tool for passive immunization of cystic
fibrosis patients**

Diplomová práce

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Praha, 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně pod odborným vedením Prof. RNDr. Petra Hodka, CSc. a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....
Lenka Pacholíková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda vyjádřila své poděkování Prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za odborné vedení této diplomové práce, cenné rady a připomínky při jejím vypracovávání.

Dále děkuji své kolegyni Bc. Libuši Noskové za spolupráci během experimentální činnosti.

Abstrakt

Cystická fibróza (CF) je jedním z nejčastějších dědičných onemocnění. Toto vrozené onemocnění, způsobené mutací genu produkujícího protein CFTR, postihuje zejména dýchací a trávicí soustavu. Z hlediska ohrožení života je nejzávažnější postižení respiračního systému. Pacienti s CF trpí opakovanými infekcemi, které vedou k rozvoji chronického zánětu a postupné destrukci plicní tkáně.

Typickým specifickým mikroorganismem kolonizujícím plíce pacientů s CF je *Pseudomonas aeruginosa*. Právě infekce plic vyvolané tímto mikroorganismem jsou nejčastější příčinou úmrtí pacientů s CF. V současnosti jsou nejčastěji v terapii infekcí *P. aeruginosa* používána antibiotika. Vzhledem ke vzniku rezistencí jsou však hledány nové možnosti terapie. Jednou z možností je pasivní imunizace CF pacientů pomocí specifických slepičích protilátek proti *P. aeruginosa*.

Pro sledování vlivu IgY na adhezi bakterií *P. aeruginosa* na buňky plicního epitelu bylo potřeba nalézt vhodný modelový systém. V této souvislosti byl hledán objektivní způsob vyhodnocení těchto adhezních testů založený na vizualizaci bakterií *P. aeruginosa* a plicních epiteliálních buněk. Nejprve bylo testováno značení bakterií *P. aeruginosa* pomocí sloučenin CellTracker, resazurinu, FITC a následně také pomocí barviva PKH 26. Značení plicních epiteliálních buněk bylo provedeno pomocí sloučenin CellTracker a PKH 26. V adhezních testech bylo využito fluorescenčního značení bakterií *P. aeruginosa* pomocí FITC poskytující fluorescenci v zelené oblasti spektra a fluorescenční značení plicních epiteliálních buněk pomocí PKH 26 poskytující fluorescenci v červené oblasti spektra.

Klíčová slova: cystická fibróza, plicní epiteliální buňky, *Pseudomonas aeruginosa*, fluorescenční značení, adhezní testy, slepičí protilátky

Abstract

Cystic Fibrosis (CF) is one of the most common hereditary diseases. This congenital condition, caused by CFTR gene mutation, affects gastrointestinal and respiratory system especially. The affection of respiratory system is considered the most serious life-threatening symptom. Patients suffer from recurrent infections proceeding to the development of chronic inflammation and progressive pulmonary tissue destruction.

A typical specific microorganism colonizing pulmonary tissue of those suffering from CF is recognised as *Pseudomonas aeruginosa*. Pulmonary infections caused by this microorganism are the most often cause of death in patients suffering from CF. Antibiotics are the first-line therapy of this condition currently. Nevertheless, the need to find alternatives occurs due to antibiotics resistance development. Passive immunization by specific hen-egg-yolk antibodies against *P. aeruginosa* is a possible alternative.

An observation of IgY influence on a bacterial adhesion to pulmonary epithelial cells required an appropriate model. In this context an appropriate adhesion testing method based on *P. aeruginosa* and pulmonary epithelial cells visualisation was searched. At first bacterial cells labelling was tested by CellTracker, resazurin, FITC and consequently PKH 26. *P. aeruginosa* fluorescent labelling by FITC (providing fluorescence in the green part of visible spectrum) and pulmonary epithelial cells fluorescent labelling by PKH 26 (providing fluorescence in the red part of visible spectrum) were used in adhesion testing.

Key words: Cystic fibrosis, Pulmonary epithelial cells, *Pseudomonas aeruginosa*, Fluorescent labelling, Adhesion testing, Chicken antibodies

Obsah

Seznam použitých zkratk.	3
1. Úvod.....	4
1.1. Cystická fibróza.....	4
1.1.1. Charakteristika CF.....	4
1.1.2. Klinické projevy CF.....	8
1.1.2.1. Respirační systém.....	8
1.1.2.2. Gastrointestinální trakt.....	9
1.1.2.3. Ostatní příznaky CF.....	9
1.1.3. Diagnostika CF.....	10
1.1.4. Léčba CF.....	12
1.1.5. Mikrobiální onemocnění CF pacientů.....	14
1.1.5.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
1.1.5.2. <i>Burkholderia cepacia</i>	17
1.1.5.3. Terapie antibiotiky.....	18
1.1.5.4. Imunizace.....	19
1.2. Imunitní systém a protilátky.....	20
1.2.1. Imunitní systém CF pacientů.....	21
1.2.2. Slepíčí protilátky.....	22
2. Cíl práce.....	24
3. Materiál a metody.....	25
3.1. Chemikálie a materiál.....	25
3.2. Přístrojové vybavení.....	27
3.3. Použité metody.....	28
3.3.1. Mikroskopie.....	28
3.3.1.1. Barvení barvivem Giemsa.....	28
3.3.1.2. Barvení trypanovou modří.....	28
3.3.2. Práce s bakteriemi.....	29
3.3.2.1. Kultivace bakterií.....	29
3.3.2.2. Kryoprezervace bakterií.....	30
3.3.2.3. Určení koncentrace bakterií.....	31

3.3.3. Izolace buněk plicního epitelu.....	32
3.3.3.1. Izolace buněk získaných pomocí metody „brushing“.....	32
3.3.4. Kultivace buněk plicního epitelu.....	33
3.3.4.1. Kultivace buněk linie A549.....	33
3.3.4.2. Kultivace primárních epiteliálních buněk.....	34
3.3.4.3. Pasážování buněk.....	34
3.3.5. Fluorescenční značení bakterií PA.....	35
3.3.5.1. Fluorescenční značení bakterií pomocí CellTracker.....	35
3.3.5.2. Fluorescenční značení bakterií pomocí resazurinu.....	37
3.3.5.3. Fluorescenční značení bakterií pomocí FITC.....	38
3.3.5.4. Fluorescenční značení bakterií pomocí PKH 26.....	40
3.3.6. Fluorescenční značení buněk A549.....	41
3.3.6.1. Fluorescenční značení buněk A549 pomocí CellTracker.....	41
3.3.6.2. Fluorescenční značení buněk A549 pomocí PKH 26.....	42
3.3.7. Adhezní testy.....	43
4. Výsledky.....	44
4.1. Izolace buněk plicního epitelu.....	44
4.1.1. Izolace buněk získaných pomocí metody „brushing“.....	44
4.2. Kultivace buněk plicního epitelu.....	46
4.2.1. Kultivace buněk linie A549.....	46
4.2.2. Kultivace primárních epiteliálních buněk.....	46
4.3. Fluorescenční značení bakterií PA.....	49
4.3.1. Fluorescenční značení bakterií pomocí CellTracker.....	49
4.3.2. Fluorescenční značení bakterií pomocí resazurinu.....	50
4.3.3. Fluorescenční značení bakterií pomocí FITC.....	53
4.3.4. Fluorescenční značení bakterií pomocí PKH 26.....	56
4.4. Fluorescenční značení buněk A549.....	61
4.4.1. Fluorescenční značení buněk A549 pomocí CellTracker.....	61
4.4.2. Fluorescenční značení buněk A549 pomocí PKH 26.....	63
4.5. Bioluminiscenční PA.....	65
4.6. Adhezní testy.....	67
5. Diskuse.....	69
6. Souhrn.....	75
7. Seznam použité literatury.....	76

Seznam použitých zkratek

ATB	antibiotika
b/ml	jednotka koncentrace, „počet bakterií v 1 ml“
Bcc	komplex <i>Burkholderia cepacia</i>
bp	páry bazí v DNA = „Base pairs“
BSA	hovězí sérový albumin
CF	cystická fibróza
CFTR	„Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator“
CFU	vyjádření počtu bakterií = „colony forming units“
CNS	centrální nervová soustava
CT	CellTracker Green CMFDA
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTA	ethyldiamintetraoctová kyselina
FCS	fetální telecí sérum = „fetal calf serum“
FITC	fluoresceinisothiokyanát
FN	fakultní nemocnice
Fuc	fukosa
hod.	hodina
Hu	označení vzorků od pacientů
IgG	imunoglobulin třídy G
IgY	imunoglobulin třídy Y
min.	minuta
nm	nanometr
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	pufrovaný fyziologický roztok = „phosphate buffered saline“
RPM	počet otáček za minutu = „revolution per minute“
TB	trypanová modř = Trypan Blue
v/v	objemová procenta
w/v	hmotnostní procenta

1. Úvod

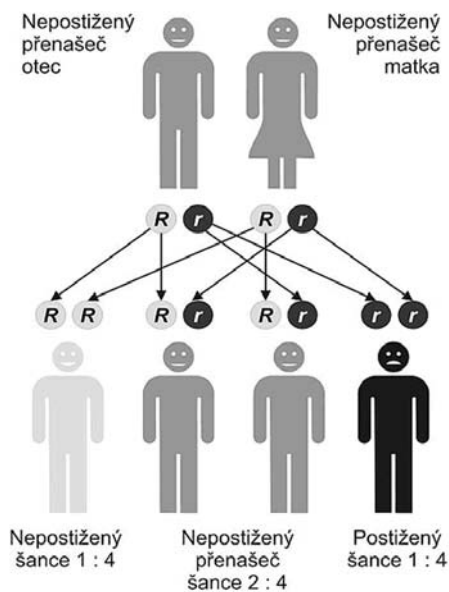
1.1. Cystická fibróza

Cystická fibróza je závažné dědičné onemocnění, na které před zavedením komplexní terapie v 70. letech 20. století umírala většina pacientů v kojeneckém věku. V současné době se díky včasné diagnostice a moderním léčebným metodám průměrná délka života pacientů s CF pohybuje okolo 30-40 let. Příčinou úmrtí nebývají samotné symptomy choroby, ale recidivující mikrobiální infekce, které později přecházejí do chronické podoby a vedou k nezvratnému poškození a nakonec až k selhávání funkce orgánů, především plic [1].

1.1.1. Charakteristika CF

Cystická fibróza neboli mukoviscidóza je autozomální recesivní vrozené onemocnění způsobené mutací genu produkujícího protein CFTR, z angl. „**C**ystic **F**ibrosis **T**ransmembrane **C**onductance **R**egulator“.

CF je jedním z nejčastějších dědičných onemocnění. V České republice se každoročně narodí s touto nemocí 1 dítě z přibližně 2500-3000 narozených dětí. Mutace genu CFTR jsou přenášeny na základě klasické mendelovské genetiky, viz obr. 1. Rodičům, zdravým přenašečům mutace genu, se s 25% pravděpodobností narodí dítě nemocné CF, s 50% pravděpodobností zdravé dítě, které bude stejně jako oni přenašečem mutace genu, a s 25% pravděpodobností zdravé dítě, které nenese žádnou mutaci genu CFTR [2].

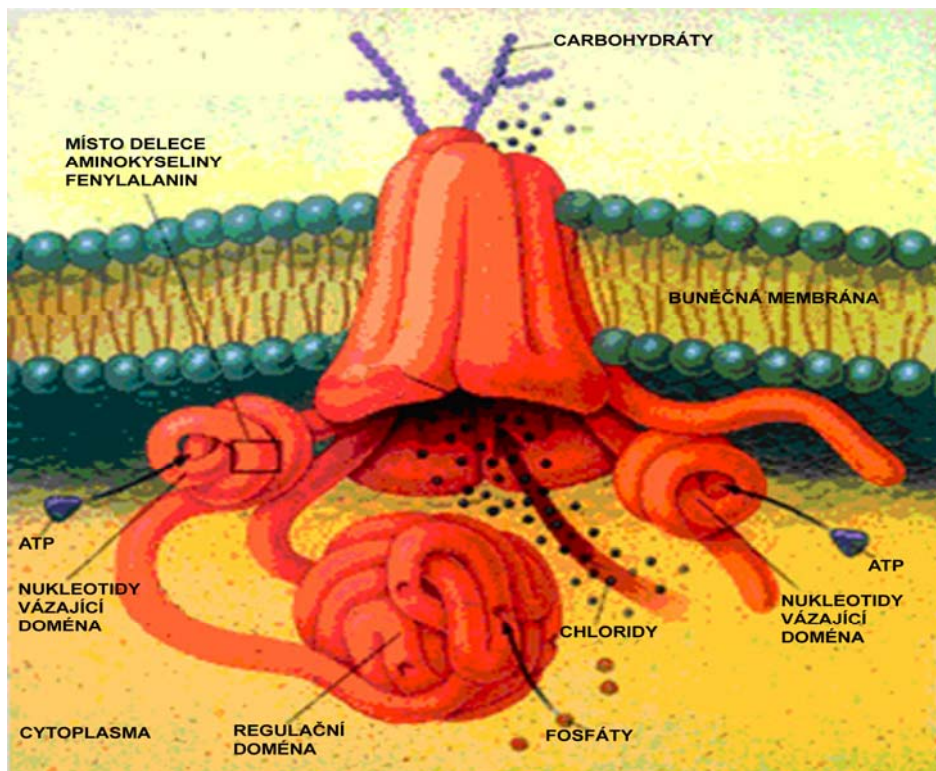


Obr. 1: Schéma dědičnosti mutace genu CFTR z rodičů na potomky. Převzato z [2].

Protein CFTR funguje jako chloridový kanál na apikální membráně epitelálních buněk. Ztráta funkce nebo snížená funkce proteinu CFTR způsobuje, že se membránový kanál stává nepropustným pro chloridové ionty. V důsledku toho se mění složení a fyzikálně chemické vlastnosti hlenu na povrchu sliznic. Hlenový sekret na povrchu epitelu se zahušťuje, stává se viskóznějším, což narušuje normální funkci orgánů a je příčinou většiny komplikací spojených s CF. Míra a závažnost komplikací závisí také i na typu mutace genu CFTR [1].

Protein CFTR se skládá ze 2 transmembránových domén, ze 2 domén, které váží nukleotidy a nukleotidfosfáty (zejména ATP), a 1 regulační domény, viz obr. 2.

Funkce chloridového kanálu není jedinou funkcí proteinu CFTR, reguluje také činnost dalších iontových kanálů (např. sodíkový kanál) [3] a slouží mimo jiné také jako „internalizační“ receptor pro oportunní mikroorganismy, zejména pro *Pseudomonas aeruginosa* nebo *Aspergillus fumigatus* [4].



Obr. 2: Schéma proteinu CFTR. Převzato z [5].

Gen pro protein CFTR je uložený na dlouhém raménku 7. chromozomu. Skládá se z 27 exonů a kóduje protein o 1480 aminokyselinových zbytcích. V současné době je známo více než 1700 mutací tohoto genu. U pacientů s CF je nejčastější mutací genu CFTR delece 3 bp, která vede ke ztrátě aminokyseliny fenylalaninu na pozici 508 proteinu CFTR. Tato mutace, která se vyskytuje u 70% pacientů s CF, se značí jako F508del [6].

Podle funkčního dopadu lze mutace rozdělit do 7 tříd [1]:

- třída I.: „narušená syntéza proteinu CFTR, který tak chybí na apikální membráně“
- třída II.: „abnormální postranlační glykosylace a intracelulární transport proteinu CFTR, spojený s jeho nepřítomností na apikální membráně“
- třída III.: „porucha regulace proteinu CFTR, který je přítomný na apikální membráně“

- třída IV.: „snížená vodivost chloridového kanálu s normálním množstvím proteinu CFTR na apikální membráně, který má reziduálně zachovanou funkci chloridového kanálu“
- třída V.: „redukováná syntéza, zhoršený intracelulární transport a snížené množství plně funkčního proteinu CFTR na apikální membráně“
- třída VI.: „ztráta regulační funkce dalších iontových kanálů“
- třída VII.: „snížená stabilita jinak plně funkčního proteinu CFTR na apikální membráně“

Mutace ze tříd IV.-VII. jsou častěji nalézány u atypických forem CF, mohou způsobovat i ne příliš typické příznaky CF a mírnější průběh onemocnění, na rozdíl od mutací ze tříd I.-III., které vedou k úplné ztrátě funkce proteinu CFTR a onemocnění má tak v tomto případě vážnější průběh. Mutace F508del, která se vyskytuje u převážně většiny nemocných CF, spadá do třídy II. [1].

1.1.2. Klinické projevy CF

Defekt proteinu CFTR je přítomen již od narození, klinické projevy v důsledku tohoto defektu se však mohou objevit kdykoli v průběhu života od kojeneckého věku po dospělost. CF v důsledku ztráty funkce nebo snížené funkce proteinu CFTR na apikální straně membrány postihuje epitelální buňky většiny orgánů, nejvíce se to však dotýká respiračního a gastrointestinálního traktu. Nejzávažnějším je postižení respiračního ústrojí, které je také nejčastějším důvodem úmrtí pacientů s CF.

První příznaky CF se u většiny nemocných dají pozorovat již v prvních měsících či rocích života. Bohužel ne vždy se jim věnuje patřičná pozornost a často se stává, že nemocní jsou diagnostikováni pozdě, již s velmi rozvinutými potížemi a komplikacemi.

1.1.2.1. Respirační systém

Postižení respiračního traktu je nejzávažnějším důsledkem CF, trpí jím bez výjimek všichni pacienti s CF. Jak již bylo uvedeno, v důsledku defektu genu CFTR se hlen stává viskóznějším a mění se jeho složení. Periciliární tekutina na povrchu epitelu dýchacích cest se stává isotonicou a ztrácí své baktericidní účinky. Důsledkem toho zde snadno vznikají infekce. U pacientů s CF dochází k silné protizánětlivé odpovědi a abnormálnímu fungování neutrofilů. Neutrofily v reakci na vzniklé infekce produkují více prozánětlivých mediátorů (interleukin IL-8) a uvolňují velké množství volných kyslíkových radikálů a proteáz, které vyvolávají hypersekreci hlenu, poškozují činnost řasinkového epitelu a tím se přímo podílejí na destrukci plicní tkáně [7].

V prvních měsících života se může CF projevit těžkou bronchiolitidou, která většinou recidivuje. Nejčastějším příznakem CF je bezesporu kašel, který přechází v chronický a je většinou spojen s produkcí sputa. Dalšími charakteristickými příznaky chronického sinopulmonálního onemocnění upozorňujícími na možnou CF jsou: obstrukce dýchacích cest spojená s hvízdáním a hyperinflací, nosní polypy a sinusitidy, bronchiektázie (abnormální rozšíření bronchů) prokázaná RTG, perzistující kolonizace nebo infekce způsobené mikroorganismy typickými pro respirační onemocnění u CF (*Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*) [1, 8].

1.1.2.2. Gastrointestinální trakt

Gastrointestinální trakt je po dýchací soustavě dalším nejvíce postiženým systémem u pacientů s CF.

Insuficience exokrinní funkce pankreatu je charakteristickým projevem CF. Pankreas je morfologicky i funkčně změněn a není schopen produkovat trávicí enzymy. Nejvíce je porušeno trávení lipidů. Je proto nutné, aby nemocní před každým jídlem užívali substituci pankreatických enzymů.

Dalšími potížemi komplikujícími život pacientů s CF mohou být: pankreatitida, diabetes mellitus vázaný na CF, gastroezofageální reflux, peptidické vředy, gastritida, mekoniový ileus, distální intestinální syndrom, onemocnění appendixu, invaginace, fibrotizující kolonopatie, prolaps rekta a jaterní onemocnění [7].

1.1.2.3. Ostatní příznaky CF

Kromě komplikací v dýchacím a gastrointestinálním traktu lze pozorovat i jiné docela časté příznaky CF [7]:

- poškození reprodukčního ústrojí - reprodukční trakt je u 98 % mužů s CF postižen kongenitální bilaterální absencí vas deferens (CBAVD), což je příčinou obstruktivní azoospermie
- poškození potních žláz - pot obsahuje 5krát více solí, při nadměrném pocení hrozí nebezpečí hypoelektrolytémického šoku
- osteoporóza - zhoršené vstřebávání vitamínu D z potravy
- paličkovité prsty - u dětí s CF se vyvíjejí časně, v době kdy mají jen mírné respirační obtíže
- kardiomyopatie
- projevy autoimunity

1.1.3. Diagnostika CF

Včasná diagnóza a následná komplexní léčba zlepšují prognózu pacientů s CF.

Nejčastěji se CF diagnostikuje na základě klinických příznaků, klinické podezření se vyslovuje, když je přítomen jeden nebo více typických klinických projevů. Diagnóza se následně potvrdí dvěma spolehlivě provedenými potními testy a molekulárně genetickým vyšetřením DNA.

- **Potní test** neboli vyšetření chloridů v potu patří mezi základní „screeningové“ metody pro diagnostiku CF. Tento zákrok je bezbolestný a provádí se ambulantně. Vyšetření trvá přibližně 45 min. a jeho výsledek je znám do 3 hod. Provádí se při něm sběr potu z předloktí, kdy se potní žlázy stimulují k pocení pilokarpinovou iontoforézou [9]. Získaný pot se chemicky analyzuje a zjišťuje se z něj množství chloridů. Normální koncentrace chloridů v potu se pohybuje mezi 10-30 mmol/l potu. U CF jsou tyto hodnoty nad 60 mmol/l. Za hraniční hodnoty koncentrací chloridů v potu se pokládají hodnoty 40 mmol/l. Nemocní s takovouto hraniční koncentrací chloridů v potu mívají obvykle mírný nebo atypický průběh [10, 11].
- **Molekulárně genetickým vyšetřením** se hledají v DNA, která je získána z krve, mutace v genu CFTR způsobující onemocnění CF. V rizikových rodinách, kde jsou rodiče zjištěnými nosiči mutací CFTR genu, lze provést prenatální molekulárně genetickou diagnostiku - již od 13. týdne těhotenství vyšetřením mikrovilárních buněk z biopsie choria nebo od 17. týdne z buněk plodové vody získaných amniocentézou. Prokáže-li se vývoj plodu s klasickou formou CF, je možné navrhnout zákonem povolené přerušení těhotenství do 24. týdne. Rodiče, kterým hrozí, že se jim s 25% šancí narodí dítě postižené CF, mohou v současnosti podstoupit umělé oplodnění, při kterém jsou k těhotenství vybrána pouze „zdravá“ embrya, která nemají dvě mutace genu pro CF - preimplantační genetická diagnostika [1, 12].

- **Novorozenecký screening CF** se od října 2009 stává součástí celoplošného „screeningu“ vybraných vrozených onemocnění. Provádí se vyšetřením kapky krve odebrané z patičky novorozence, ze které se testují i další vrozená onemocnění.

Ze suché kapky krve se na filtračním papírku vyšetří imunoreaktivní trypsin (IRT). IRT je produkt pankreatu, jehož koncentrace bývá v krvi novorozeneckých dětí s CF o něco vyšší než u dětí ostatních. IRT je senzitivní, ale relativně málo specifický. Když je koncentrace IRT zvýšená, následuje ještě DNA analýza nejčastějších mutací genu CFTR. Pokud jsou nalezeny 2 mutace, je diagnóza CF velmi pravděpodobná a dítě je voláno k potnímu testu (který vyloučí případnou záměnu) a k zahájení léčby. Pokud je nalezena pouze 1 mutace, je nutné potním testem objasnit, zda se jedná o zdravého nosiče nebo pacienta s CF, která je způsobena vzácnější a tedy nevyšetřenou mutací. V případě, kdy je koncentrace IRT extrémně zvýšená a DNA analýza neprokáže žádnou mutaci, následuje opakování měření IRT, tzv. IRT recall [13, 14].

1.1.4. Léčba CF

V současné době je CF zatím nevyléčitelné, ale léčitelné onemocnění. Cílem léčby je především zmírnění obtíží, které toto onemocnění s sebou přináší, a zabránění jejich zhoršování. Hlavními body **komplexní terapie** jsou [11]:

- **péče o dobrou průchodnost dýchacích cest inhalacemi a následnou fyzioterapií (dechová fyzioterapie a pohybové aktivity)** - nemocným CF se tvoří v plicích hustý hlen; inhalují léky, které tento hustý hlen ředí a zlepšují tak průchodnost dýchacích cest; inhalace pacienti s CF provádějí 3krát denně formou speciálního inhalačního dýchání, které je naučí fyzioterapeut; každá inhalace trvá 10–15 minut.
- **péče o dobrý stav výživy, tj. vysokokalorická strava a užívání trávicích enzymů** - nemocní CF s insuficiencí exokrinní funkce pankreatu musí užívat před každým jídlem substituci pankreatických enzymů ve formě acidorezistentních minimikropelet v želatinových kapslích v dávce 10 000 j. lipázy/kg/den; strava musí být vysokokalorická, na 130–150 % doporučených denních dávek pro běžnou populaci (i přes substituci pankreatickými enzymy je nutné počítat s nedostatečnou resorpcí i zvýšeným výdejem energie při práci dýchacích svalů a expektoraci).
- **potlačení infekce a zánětu protizánětlivou antibiotickou léčbou** - antibiotika se nasazují ihned při prvních známkách infekce a ve vysokých dávkách; při každé akutní exacerbaci respirační infekce je na místě u pacientů s CF naordinovat antibiotika širokospektrá, s protistafylokokovým účinkem (amoxicilin s klavulanátem, kotrimoxazol, cefalosporiny I. a II. generace, doxycyklin); dávkování je vždy na horní hranici dávkovacího rozmezí, minimálně na 14 dnů; léčbu antibiotiky je vhodné doplnit o léčbu protizánětlivou - byl prokázán pozitivní vliv ne-antibakteriálních účinků makrolidů (azitromycin), které nejen zlepšují reologické vlastnosti sputa, ale působí i proti zánětlivým cytokinům IL-1 a IL-8.
- **léčba komplikací spjatých s CF** - v rámci pravidelných kontrol je nutné pátrání po příznacích možných komplikací tak, aby se případně začalo včas s jejich léčbou; častou komplikací u pacientů s CF je na CF vázaný diabetes mellitus, cirhóza jater, osteoporóza a další.

Nelze-li průběh onemocnění u pacientů s CF zvládnout ani intenzivní antibiotickou léčbou, je jediným možným řešením transplantace plic. U pacientů kolonizovaných *B. cepacia* je výrazně vyšší pooperační riziko infekčních komplikací, nejsou tedy obvykle k transplantaci plic indikováni [15].

V současné době jsou vkládány velké naděje do léků, které by upravovaly transport iontů chloridovými kanály na apikální membráně buněk. Nedávno proběhla studie s inhalačním použitím látky, která upravuje rovnováhu vody a solí v hlenu CF a ovlivňuje vodivost kanálů tím, že zvyšuje sekreci Cl^- a stimuluje aktivitu chloridových kanálů. Probíhají také studie s tzv. korektory a potenciátory defektního CFTR proteinu. Jedná se o látky Vertex VX-770 a VX-809, které buď upravují chybu ve vycestování (trafficking) špatně nařazené bílkoviny CFTR směrem k buněčné membráně, nebo které zvyšují omezené otevírání (gating) CFTR kanálu pro chloridové ionty [11].

1.1.5. Mikrobiální onemocnění CF pacientů

Onemocnění CF postihuje s výjimkou CNS všechny systémy. Jak již bylo uvedeno, nejvíce postiženy jsou dýchací a trávicí soustava. Nejčastější a z hlediska ohrožení života nejzávažnější je postižení dýchacích cest. V důsledku defektu v proteinu CFTR dochází k chybnému transportu iontů chloridovými kanály na apikální membráně buněk v hlenových žlázách a k produkci vazkého hlenu. To způsobuje poruchu mukociliární clearance a obstrukce dýchacích cest hlenem, který je ideální živnou půdou pro bakterie a viry. Pacienti s CF trpí opakovanými infekcemi, které vedou k rozvoji chronického zánětu a postupné destrukci plicní tkáně. Chronické plicní infekce a komplikace s nimi spojené jsou nejčastější příčinou úmrtí u pacientů s CF. Typickými oportunními patogeny, které mohou osídlovat plíce pacientů s CF, jsou *Pseudomonas aeruginosa* a *Burkholderia cepacia*. Kromě těchto patogenů specifických pro nemocné CF se mohou vyskytovat i další patogeny vyvolávající respirační infekce, především jsou to *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* a *Streptococcus pneumoniae*. Poměrně časté jsou u pacientů s CF také mykotické infekce, vyvolané nejčastěji *Aspergillus fumigatus* [1].

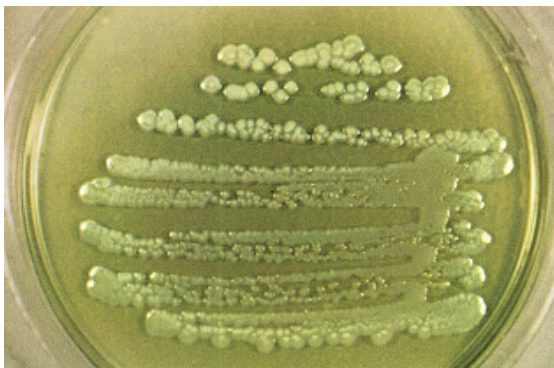
1.1.5.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Typický zástupce rodu *Pseudomonas* je zobrazen na obr. 3. Jde o gramnegativní aerobní tyčinkovitou bakterii, která se vyskytuje ve vodě (odpadní vody, vodovodní kohoutky, hlavice sprch) či v půdě. Běžně se vyskytuje také v nemocničním prostředí, kde může způsobit kontaminaci různých lékařských pomůcek. Nalezena byla také na povrchu čerstvé zeleniny a ovoce [1].



Obr. 3: Snímek PA ze skenovacího elektronového mikroskopu. Převzato z [16].

Co se týká podmínek kultivace, jsou to nenáročné bakterie. Mají velmi malé nutriční požadavky, tolerují i vysoké koncentrace solí a rostou v neutrálním pH. Optimální teplota pro růst je v rozmezí 30-37 °C, ale jsou schopny růst i při teplotě dosahující až 42 °C. Pohyb je zajištěn pomocí jednoho či více polárních bičíků. Byla u nich pozorována také aerotaxe a chemotaxe [17].



Obr. 4: Příklad kolonií PA na agaru. Převzato z [17].

P.aeruginosa může vytvářet tři typy kolonií (viz obr. 4) [17]:

- malé hrubé nepravidelné kolonie – izolované z půdy či vody
- velké hladké kolonie s plochými konci – izolované z klinických vzorků pacientů s akutní infekcí PA
- mukoidní, spojené s tvorbou alginátu – izolované z klinických vzorků pacientů s chronickou kolonizací PA

Pro pacienty s CF je typická mukoidní forma *P.aeruginosa* spjatá s tvorbou anaerobního biofilmu, přes který se antibiotika jen obtížně dostávají.

Bakterie PA jsou schopné produkovat několik pigmentů, modrý pyocyanin, žlutozelený fluorescein a fluoreskující pyoverdin, které působí jako siderofory při přijímání iontů železa z okolí. Některé z těchto pigmentů mohou působit také jako virulenční faktory [17].

P.aeruginosa je oportunní lidský patogen. Nejvíce ohrožuje právě pacienty s CF a osoby se sníženou schopností obrany. Kolonizuje především sliznice respiračního traktu a močových cest, ale způsobuje i řadu dalších zdravotních komplikací [17]:

- endokarditida
- bakterémie a septikémie
- infekce CNS
- ušní infekce
- oční infekce
- infekce kostí a kloubů
- infekce gastrointestinálního traktu
- kožní infekce

Problémem v případě infekcí *P.aeruginosa* je fakt, že tyto bakterie jsou přirozeně rezistentní vůči široké škále antibiotik a navíc, jak již bylo zmíněno, jsou schopny produkovat alginát, který napomáhá rezistenci vůči antibiotikům [18].

S věkem výrazně stoupá možnost propuknutí infekce *P.aeruginosa*, v dospělosti je tímto mikroorganismem chronicky infikováno až 80% pacientů s CF [19].

Infekce *P.aeruginosa* obvykle nevyvolá náhlé zhoršení stavu pacienta. Na začátku často probíhá asymptomaticky, později však v mnoha případech přechází do chronické podoby a je zodpovědná za zhoršování funkce plic a celkové zhoršování stavu a prognózu pacientů s CF [20, 21].

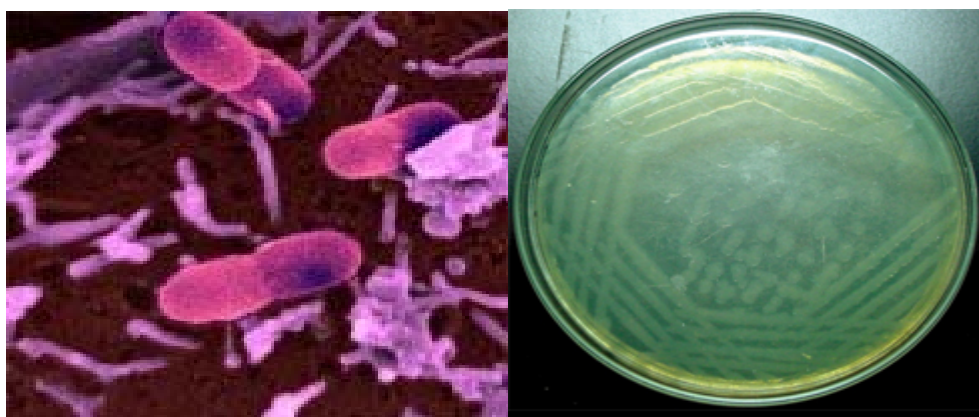
Infekce se snadno přenáší mezi pacienty s CF, ale nenapadá zdravé jedince. Tato skutečnost, proč je *P. aeruginosa* tak specifickým patogenem právě u CF, není stále jednoznačně zodpovězena. Předpokládá se, že svůj podíl na tom má změněné prostředí v pacientově dýchacím traktu. Na povrchu epitelálních buněk pacientů s CF je vyšší podíl asialylovaných glykolipidů, které slouží jako receptory pro vazbu bakteriálních lektinů [22]. Vyšší afinita bakterií *P.aeruginosa* byla zjištěna také vůči mucinu pacientů s CF [23].

Infekci obvykle zahajuje nemukoidní forma bakterie, která ale v průběhu infekce u pacientů s CF konvertuje v mukoidní formu produkující exopolysacharid alginát. Alginátové obaly sousedních buněk mají tendenci se spojovat a vytvářet tak biofilm. Průběh infekce u mukoidního typu je tak horší, protože alginátový obal zajišťuje ochranu před antibiotiky a fagocytózou [24].

Proto je důležitá prevence a případné zastavení infekce včas v nemukoidní formě, kdy je ještě možná eradikace bakterií pomocí antibiotik.

1.1.5.2. *Burkholderia cepacia*

Poprvé byla tato bakterie popsána v roce 1950 Walterem Burkholderem jako příčina hniloby cibule. Morfologicky je velmi podobná *Pseudomonas aeruginosa* (viz obr. 5). Dlouhou dobu byla označována jako *Pseudomonas cepacia* a chybně řazena do rodu *Pseudomonas*. Teprve počátkem 90. let získala název *Burkholderia* a byla zařazena do vlastní skupiny. V současnosti se dělí do 17 podtypů, které jsou souhrnně označovány jako *komplex Burkholderia cepacia* (Bcc) [27].



Obr. 5: Snímek Bcc z elektronového mikroskopu (vlevo). Převzato z [25].

Příklad kolonií Bcc na agaru (vpravo). Převzato z [26].

Je to gramnegativní aerobní tyčinkovitá bakterie, která se běžně vyskytuje ve vodě (stojaté vody, řeky i jezera) či v půdě, kde žije v symbióze s kořeny rostlin. Nalezena byla také na povrchu zeleniny, v kosmetických přípravcích, v nepasterizovaném kravském mléku či v dezinfekčních roztocích [28].

B. cepacia je oportunní lidský patogen, ale díky své schopnosti využívat jako zdroj uhlíku celou řadu organických látek (ftaláty, chlorované uhlovodíky, dokonce i penicilin G) může být uplatněna i jako biodegradační agens. Produkuje rostlinné hormony, řadu antibiotik a také látky s antifungálním účinkem (cepacin, cepaciamid, chinolon pseudan) [29].

B. cepacia je nejnebezpečnější patogen pro pacienty s CF. Je také stejně jako PA primárně rezistentní vůči široké škále ATB. V případě dlouhodobého užívání použitelných ATB (ceftazidim, meropenem, piperacillin) dochází ke ztrátě citlivosti a kmeny se mohou stát rezistentními vůči všem ATB. Účinnost antibiotické léčby se snižuje i díky schopnosti přežívání *B.cepacia* v makrofázích či v epiteliálních buňkách[30].

B. cepacia je schopna stejně jako PA vytvářet biofilm, a to díky tvorbě exopolysacharidu cepacianu, který je obdobou alginátu u *P. aeruginosa* [31].

Infekce často probíhá současně s infekcí PA asymptomaticky nebo jako progresivní plicní onemocnění, které vede k náhlému zhoršování stavu pacienta a k rozvoji nebezpečné a život ohrožující pneumonie a sepse [1].

1.1.5.3. Terapie antibiotiky

K léčbě bakteriální infekce je obvykle první volbou každého lékaře terapie antibiotiky. Na léčbu infekcí způsobených *P. aeruginosa* a *B. cepacia* se používají antibiotika polymyxin B, kolistin, gentamycin, ciprofloxacin, imipenem a fluorochinoly [32, 33].

Jak již bylo zmíněno, je antibiotická léčba u bakterií *P. aeruginosa* a *B. cepacia* komplikována vznikem rezistencí. Podáváním antibiotik se sice zpomalí průběh kolonizace pacienta, ale nedojde k úplné eradikaci patogenu. Navíc opakovaným dlouhodobým podáváním ATB ve větším množství se organismus pacienta značně vyčerpává a oslabuje. Hledají se tak nové možnosti terapie, mezi něž v současné době patří využití aktivní a pasivní imunizace.

1.1.5.4. Imunizace

Aktivní imunizace probíhá formou vakcinace pacientů specifickými vakcínami. Jsou testovány jak monovalentní vakcíny (proti jednotlivým antigenům PA), tak vakcíny polyvalentní (proti více antigenům PA najednou). Slibnou se zdá být monovalentní vakcína proti bičíkovému antigenu bakterie PA, která je ale prozatím stále ve fázi klinického zkoušení. Největší naděje byly směřovány k vakcínám na bázi alginátu, namířeným proti mukoidním formám PA, ale bohužel žádná z těchto vakcín nevyvolala dostatečnou imunogenicitu [34]. Nevýhoda aktivní imunizace spočívá v tom, že pacienti musejí být proti danému antigenu imunizováni s dostatečným předstihem a musejí být schopni dostatečně velké imunitní odpovědi na podaný antigen [1]. V případě pacientů s CF nedochází i přes adekvátní protilátkovou reakci k eradikaci *P. aeruginosa* [52]. Příčinou je tvorba hustého hlenu v dýchacích cestách nemocných a následná kolonizace dýchacích cest mikroorganismem *P. aeruginosa*. Protilátková odpověď takto kolonizovaných pacientů není obvykle již účinná.

Výhodou **pasivní imunizace** je, že není nutný velký časový předstih a může být preventivně prováděna opakovaně po delší dobu. Zajímavé výsledky přinesly pokusy s pasivní imunizací pomocí slepičích protilátek připravených proti bakterii PA. Malé skupince pacientů byly tyto specifické protilátky podávány perorálně a pravidelně jim bylo odebíráno sputum, které bylo následně kultivováno pro zjištění přítomnosti PA. Frekvence výskytu PA se snížila a stejně tak i frekvence ostatních mikroorganismů. Slepičí protilátky se zdají být dobrým nástrojem k prevenci infekcí způsobených PA [35, 36, 37]. Nicméně pro vyvození závažnějších závěrů by bylo potřeba, aby se studie zúčastnilo více pacientů a výsledky by pak měly větší vypovídající hodnotu.

1.2. Imunitní systém a protilátky

Imunitní systém patří mezi základní homeostatické mechanismy organismu. Imunitní systém je souhrn mechanismů zajišťujících integritu organismu rozeznáváním a likvidací cizích či vlastních, potenciálně škodlivých struktur [38].

Vyznačuje se [38]:

- **obranyschopností** - imunitní systém rozpozná škodliviny z vnějšího prostředí a chrání tak organismus proti patogenním mikroorganismům a jejich toxickým produktům
- **autotolerancí** – imunitní systém rozpozná vlastní tkáně organismu a udržuje vůči nim toleranci
- **imunitním dohledem** – imunitní systém rozpozná škodliviny z vnitřního prostředí, průběžně odstraňuje staré, poškozené a některé změněné zmutované buňky

Podle povahy imunitní obrany rozlišujeme imunitu buněčnou a humorální (látkovou). Buněčnou imunitu zajišťují bílé krvinky, látkovou pak protilátky (imunoglobuliny).

Podle specifity rozlišujeme imunitu vrozenou a adaptivní [39]:

- **vrozená** neboli **nespecifická imunita** – slouží jako první obrana vůči infekci, při vrozené imunitě se hojně uplatňují tzv. fagocyty (makrofág, neutrofil), schopné pohltit cizorodé částice v těle, zahrnuje jak buněčnou, tak látkovou imunitu
- **adaptivní** neboli **specifická imunita** – uplatňuje se, až když dojde k infekci organismu; její podstatou je produkce protilátek, které se specificky vážají na antigeny a umožňují jejich následnou eliminaci, zahrnuje jak buněčnou (T-lymfocyty), tak látkovou imunitu (B-lymfocyty)

1.2.1. Imunitní systém CF pacientů

Imunitní systém u pacientů s CF je při narození plně kompetentní. Zpočátku byl imunitní systém nemocných CF zkoumán hlavně v souvislosti s plicní infekcí, kterou pacienti s CF trpí. Nebyla však nalezena žádná forma primární imunodeficiency, která by přispívala ke chronické kolonizaci plic bakteriemi. Ukázalo se, že imunitní systém nemocných CF reaguje adekvátně na přítomnost infekce, avšak celkové okolnosti CF patogeneze (viskózní hlen, porušení mukociliární clearance) znemožňují eradikaci typických patogenů [40].

Změny v imunitních parametrech jsou považovány za sekundární, rozvíjejí se až s průběhem nemoci a jsou charakterizovány postupně se rozvíjející až extrémní hypergamaglobulinémií, v laboratorních nálezech bývá také vysoká hodnota cirkulujících imunokomplexů. Ve srovnání s normální dětskou populací byla u dětských CF pacientů zjištěna mírná celková hypogamaglobulinémie v časném věkovém období (od prvního do třetího roku života), následovaná typickou hypergamaglobulinémií v pozdějším věku. Snížení imunoglobulinů se promítá do IgG, a při specifikaci vyšetření podtříd IgG se jedná o snížení v IgG2. Vzhledem k tomu, že protilátky izotypu IgG2 hrají významnou roli v obraně proti kmenům *Pseudomonas*, jež jsou základním patogenem u onemocnění CF, mohl by tento deficit v raném dětství pacientů s CF přispívat k pozdější dlouhodobé až trvalé kolonizaci pacientů těmito mikroorganismy [41].

Důležitým mezníkem se zdá být objev cílového antigenu antineutrofilních cytoplasmických protilátek (ANCA), jímž je látka nazývaná BPI. BPI je baktericidii/permeabilitu zvyšující protein. Jedná se o velmi účinnou látku patřící k baktericidní výbavě neutrofilů, která neutralizuje lipopolysacharid (LPS), invazivní produkt gramnegativních bakterií. Vzhledem k perzistenci právě gramnegativních bakterií u CF se ukazuje přítomnost protilátek proti BPI jako důležitý faktor. Antineutrofilní cytoplasmické protilátky namířené proti BPI mohou ovlivňovat dlouhodobý klinický průběh CF [41].

1.2.2. Slepíčí protilátky

Protilátkami je označována skupina proteinů, tzv. imunoglobulinů, což jsou glykoproteiny a jejich komplexy s molekulovou hmotností v rozmezí 150-900 kDa. V organismu zajišťují specifickou imunitu. Vyskytují se buď volně sekretované v krevní plazmě, nebo jako povrchové receptory některých lymfocytů. Molekuly imunoglobulinů mají tvar písmene „Y“ a skládají se ze dvou identických lehkých (L, light) řetězců, a dvou těžkých (H, heavy) řetězců, které jsou navzájem spojeny pomocí disulfidových můstků. Každý řetězec můžeme pomyslně rozdělit na funkční oblasti - domény. Část řetězců směrem k N-konci se nazývá variabilní oblast, zde dochází k vazbě na antigen. Úsek řetězce směrem k C-konci se nazývá konstantní oblast. Imunoglobuliny lze rozdělit do několika tříd (IgA, IgE, IgG, IgM, IgD) [42].

Protilátky mohou působit několika mechanismy [38]:

- **opsonizace** – vazba protilátky na mikroorganismy a antigenní částice umožní jejich pohlcení fagocytujícími buňkami
- **neutralizace** – protilátky se váží na kritické epitopy virů, bakterií a toxinů a tím blokují (neutralizují) jejich funkci
- **aktivace komplementu** – dále opsonizuje mikroorganismus, přispívá k chemotaxi fagocytů a podporuje zánět

Ptačí varianta IgG se nachází ve vysoké koncentraci ve vaječném bílku (egg yolk), odtud označení IgY. Struktura ptačího IgG je odlišná od savčího analogu zejména přítomností 4 domén (savčí IgG pouze 3). Předpokládá se, že chybějící doména u savců se přeměnila na tzv. pantovou oblast, která je u ptačích IgY rigidní [53].

Slepíčí protilátky typu IgY mají molekulovou hmotnost přibližně 170 kDa. Slepice při produkci vejce sekretuje do bílku imunoglobuliny typu IgA a IgM a do vaječného žloutku imunoglobuliny typu IgY. Koncentrace protilátek ve žloutku je 1,3-1,9 krát vyšší než v krvi slepice. Po vylíhnutí kuřete přecházejí IgY ze žloutku do krve kuřete a zajišťují mu krátce po vylíhnutí pasivní imunizaci [54].

V jednom žloutku je asi 50-100 mg IgY, z toho až 10 mg může tvořit specifická protilátka proti určitému antigenu. Vysoká koncentrace protilátek přináší z hlediska izolace značnou výhodu [43].

Výhodou použití slepičích protilátek pro pasivní imunizaci pacientů s CF je fakt, že IgY na rozdíl od IgG nereagují se savčími Fc-receptory a neaktivují komplementovou kaskádu. Z důvodů snížené flexibility protilátek IgY komplexy antigen-IgY precipitují méně než imunokomplexy se savčími protilátkami [44]. Tyto vlastnosti IgY jsou potencionálně výhodné právě pro pacienty s CF, kteří jsou nejvíce ohroženi zánětlivými reakcemi a precipitací imunokomplexů zhoršující funkci plic.

Kromě toho, že jsou vejce důležitým zdrojem živin potřebných pro vyvíjející se embryo, obsahují také mnoho komponent potenciálně prospěšných pro lidské zdraví. Mají například antimikrobiální aktivitu, ta je spojována především s IgY [45].

Slepičí protilátky IgY byly již produkovány proti mnohým mikroorganismům (např. *Staphylococcus aureus*) a byla potvrzena jejich schopnost vázat se na jejich části a zabraňovat tak infekci [45].

Pozitivní účinek slepičích protilátek byl prokázán ve studii in vivo na pacientech s CF, kteří užívali IgY proti PA orálně. Snížilo se množství infekcí PA a celkově pacienti lépe prospívali [37]. Bylo by vhodné se dále touto problematikou zabývat a zkoumat vliv protilátek IgY na adhezi *P. aeruginosa* na plicní epitel pacientů s CF.

2. Cíl práce

Cílem této práce bylo navrhnout vhodný modelový systém pro studium adheze bakterií *Pseudomonas aeruginosa* na buňky plicního epitelu a sledování vlivu IgY na tento proces. Zásadním dílčím úkolem bylo nalezení vhodné metody vizualizace bakterií a epiteliálních buněk pro adhezní testy.

3. Materiál a metody

3.1. Chemikálie a materiál

AstraZeneca, GB:

Meropenem

Biochrom, Německo:

FCS Superior; Gentamycin; Amphotericin B

Corning, USA:

destičky CellBind® 96 jamek, černé

Duchefa, Nizozemsko:

Chloramfenikol; Kanamycin

Fluka, Německo:

Coomassie Brilliant Blue R-250; DMSO (dimethylsulfoxid); Giemsa stain

Invitrogen, UK:

CellTracker Green CMFDA; LHC-9 medium

Koch-Light Laboratories, GB:

Deoxyribonuclease I ex bovine pancreas

Lachema, Brno, ČR:

CaCl₂; D-glukosa; EDTA; ethanol; glycerol; glycin; HCl; K₂SO₄; KH₂PO₄; L-alanin; L-asparagin; L-asparagová kyselina; L-cystein; L-fukosa; L-glutamin; L-prolin; methanol; MgCl₂; MgSO₄; Na₂CO₃; Na₂HPO₄ · 12 H₂O; NaCl; NaH₂PO₄ · 2 H₂O; NaOH; NH₄Cl

Merck, USA, Německo:

trypsin-inhibitor ze sójových bobů (Trypsin-Inhibitor aus Sojabohnen)

Millipore, USA:

ultrafiltrační zkumavka Amicon Ultra 30K

Nunc, InterMed, Dánsko:

Nunc Immuno Modules Polysorb a Maxisorb

PAA Laboratories, Rakousko:

Dulbecco's MEM High Glucose (DMEM)

Rockland, USA:

BSA fraction V

Serva, Německo:

Ampicilin

SIGMA, Německo, USA:

PKH 26 Red Fluorescent Cell Linker Mini Kit for General Cell Membrane Labeling;

PKH 67 Green Fluorescent Cell Linker Mini Kit for General Cell Membrane Labeling;

trypsin (TPCK threated, Type XIII Bovine)

SVUS Pharma a.s., Hradec Králové, ČR:

Ceftazidim Genim

3.2. Přístrojové vybavení

analytické váhy 40 SM	PESA
centrifuga Eppendorf 5430	Eppendorf
centrifuga MicroCentaur	Sanyo
CO ₂ inkubátor	ShellLab
laminární box BIO 126	Labox
laminární box Clean Air®	
mikrobiologický bezpečnostní box Labox MB 120	Labox
mikroskop	Carl-Zeiss
mikroskop Nikon ECLIPSE TE2002-U s programem NIS-Elements AR 2.30	
pH metr model 370	ATI Orion
předvážky EW 600	KERN
sonikátor ELMasonic E 30 H	P-Lab
spektrofluorimetr Perkin Elmer L55 s programem FL Winlab	
spektrofluorimetr Varioscan Flash V7	
spektrofluorimetr Biotek Synergy 2	
spektrofluorimetr Infinite M200 PRO	Tecan
spektrokolorimetr Spekol	Carl-Zeiss
třepačka MiniRocker	Eppendorf

3.3. Použité metody

3.3.1. Mikroskopie

Buňky v kultivačních lahvích, v jamkách na destičkách nebo vzorky na podložních sklíčkách byly pozorovány na invertovaném mikroskopu Nikon ECLIPSE TE2002-U s programem NIS-Elements AR 2.30. Tímto přístrojem byly také pořízeny všechny snímky uvedené ve výsledcích.

3.3.1.1. Barvení barvivem Giemsa

Barvivo Giemsa barví buňky modře až fialově a zároveň vizualizuje přítomné bakterie.

Postup:

Na podložní sklíčko bylo nanášeno 10 µl buněčné suspenze, pomocí mikrobiologické kličky byl nanášený vzorek rozetřen a nechán zaschnout. Vzorek byl fixován pomocí 10% (v/v) formaldehydu a nechán opět cca 10 min. zaschnout a následně opláchnut destilovanou vodou. Poté byl aplikován roztok 0,1% (w/v) Giemsa v destilované vodě tak, aby se převrstvil vzorek na sklíčku, inkubováno asi 15 min., sklíčko opláchnuto destilovanou vodou a mikroskopováno.

3.3.1.2. Barvení trypanovou modří

Viabilita izolovaných a rozmražených buněk byla hodnocena pomocí barvení trypanovou modří. Trypan Blue (TB) je toxické barvivo, které je z živých buněk okamžitě aktivně vylučováno přes buněčnou membránu. Po smísení buněčné suspenze s roztokem TB proto živé buňky zůstávají světlé, bezbarvé, zatímco poškozené apoptické a nekrotické buňky se barví modře [46].

Postup:

Na umyté podložní sklíčko byla nanesena kapka 10 μ l buněčné suspenze a k té byl přidán 1 μ l 0,4 % (w/v) TB, pomocí krycího sklíčka rozetřeno a mikroskopováno. Na základě barvení TB bylo odhadnuto poměrné zastoupení vitálních a mrtvých buněk.

3.3.2. Práce s bakteriemi

Ve spolupráci s Ústavem lékařské mikrobiologie FN Motol byly poskytnuty následující bakteriální kmeny *Pseudomonas aeruginosa*:

- PA – sbírkový kmen mukosní formy *Pseudomonas aeruginosa*
- PAK – sbírkový kontrolní kmen *Pseudomonas aeruginosa*
- PACF – kmen *Pseudomonas aeruginosa* izolovaný z pacienta s CF

Pro naše experimenty byly použity kmeny PA a PAK.

Testovány byly také dva kmeny bioluminiscenční *Pseudomonas aeruginosa*:

- PA-LUX
- PA-XEN 41

3.3.2.1. Kultivace bakterií

Použité roztoky:

- PS medium: 1,6% (w/v) Pepton; 1% (w/v) enzymatický kaseinový hydrolyzát; 57 mM K_2SO_4 ; 15 mM $MgCl_2$; 0,5% (v/v) glycerol; sterilizováno v autoklávu 20 min. při 121°C
- M9 medium: 16,8 mM Na_2HPO_4 ; 22 mM KH_2PO_4 ; 5 mM NaCl; 49 mM NH_4Cl ; sterilizováno v autoklávu 20 min. při 121°C; poté následně přidáno 2 mM

MgSO₄; 0,1 mM CaCl₂; 0,2% (w/v) glukosa; sterilizováno přes mikrobiální filtr porozity 0,22 µm

Postup:

Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* byly pomocí mikrobiologické kličky přeneseny do media a poté kultivovány přes noc na třepacím inkubátoru při 37 °C. Kultivace probíhala ve dvou typech medií. První medium, označované jako PS, je optimální pro kultivaci bakterií typu *Pseudomonas*. Druhé medium, označované jako M9, je medium minimální, které stimuluje bakterie k produkci lektinů [47].

3.3.2.2. Kryoprezervace bakterií

Pro dlouhodobé uchování bakteriálních kultur bylo využito kryoprezervace.

Použité roztoky:

- konzervační medium: 40% (w/v) glycerol; v PBS-ELISA: 0,134 M NaCl; 1,8 mM Na₂HPO₄; 1 mM NaH₂PO₄; pH 7,2; sterilizováno přes mikrobiální filtr porozity 0,22 µm

Postup:

Bakterie byly naočkovány do PS media, kultivovány přes noc na třepacím inkubátoru při 37 °C a následně alikvotovány do mikrozskumavek eppendorf vždy smísením 100 µl bakteriální suspenze a 100 µl konzervačního media. Poté byly vzorky zmrazeny v tekutém dusíku a uchovávány v -80°C.

3.3.2.3. Určení koncentrace bakterií

Použité roztoky:

- PBS-ELISA: 0,134 M NaCl; 1,8 mM Na₂HPO₄; 1 mM NaH₂PO₄; pH 7,2

Postup:

Bakteriální suspenze byla rozdělena do mikrozkušavek eppendorf a centrifugována na MicroCentaur (10 min., 13 000 RPM). Pelety byly resuspendovány 1-2 ml PBS-ELISA a na spektrokolorimetru Spekol byla stanovena absorbance při 600 nm. Pro výpočet koncentrace byl použit následující vztah [48]:

$$\text{CFU} = A_{600} \cdot 10^8$$

CFU..... koncentrace bakterií v b/ml

A₆₀₀.....absorbance při 600 nm

,

3.3.3. Izolace buněk plicního epitelu

Pro studium interakce buněk plicního epitelu s bakteriemi *Pseudomonas aeruginosa* byly získány buňky od dárců s CF pomocí metody „brushing“ [56]. K optimalizaci metody a ke srovnání byla využita i linie lidských plicních pneumocytů odvozených z plicního karcinomu, linie buněk A549.

3.3.3.1. Izolace buněk získaných pomocí metody “brushing”

Touto metodou byly buňky získávány se souhlasem pacientů s CF při bronchoskopickém vyšetření ve FN Motol. Buňky jsou při tomto vyšetření zachyceny na speciální kartáček, odtud název této metody “brushing”.

Použité roztoky:

- LHC-9 medium s 10% (v/v) FCS
- roztok DNasy I: 50 µg/ml DNasy I v PBS-ELISA
- zásobní roztok TB: 4 mg/ml v PBS-ELISA
- 0,1% (w/v) Giemsa v destilované vodě

Postup:

Kartáček se zachycenými buňkami byl vložen do media LHC-9 s 10% (v/v) FCS. Získané buňky byly uchovávány v chladu. Ke vzorku byl nejdříve přidán roztok DNasy I, s jehož pomocí se uvolnily i buňky zachycené v hlenu. Buňky byly inkubovány s roztokem DNasy I 10 min. na ledu. Poté následovala filtrace přes mikrofiltr o porozitě 70 µm (Falcon, BD). Takto získaná suspenze byla postupně centrifugována na MicroCentaur (10 min., 2 000 RPM) a vzniklá peleta byla resuspendována ve 400 µl LHC-9 media. Buňky byly barveny jak pomocí Giemsy (viz kap. 3.3.1.1.), tak pomocí TB (viz kap. 3.3.1.2.), aby se stanovila přibližná viabilita buněk.

3.3.4. Kultivace buněk plicního epitelu

Buňky plicního epitelu získané z izolací metodou „brushing“ a buňky linie A549 byly kultivovány za různých podmínek. Jejich kultivace se lišila hlavně ve složení kultivačního media - buňky linie A549 byly kultivovány v DMEM mediu s 10% (v/v) FCS, buňky získané „brushingem“ kultivovány v LHC-9 mediu bez přídavku FCS. Ke všem kultivovaným buňkám byla do medií preventivně přidávána antibiotika - Ampicilin (100 µg/ml), Amphotericin B (0,5 µg/ml), Gentamycin (50 µg/ml), Chloramfenikol (100 µg/ml) a Kanamycin (100 µg/ml).

Buňky byly kultivovány ve speciálních kultivačních lahvičkách o různé ploše - 12,5 cm², 25 cm² a 75 cm² a pak také na destičkách - černá CellBind (Corning, 96 jamek, dále značena jako destička A), bílá pro spektrofotometr Perkin Elmer (96 jamek, destička B), Polysorb (96 jamek, destička C).

Všechny buňky byly kultivovány v inkubátoru při 37°C a 5% CO₂.

Veškeré práce s buňkami probíhaly v laminárním boxu, který byl před prací vždy sterilizován UV zářením. Pro tyto účely byla zařízena na naší fakultě sterilní tkáňová místnost, aby se co nejvíce zabránilo případné kontaminaci z okolí.

3.3.4.1. Kultivace buněk linie A549

Jde o odvozenou linii lidských plicních pneumocytů. Tyto buňky jsou méně náročné na složení kultivačního media, celkem ochotně adherují a dělí se. Jejich kultivace probíhala v DMEM mediu doplněném o aminokyseliny: 0,28 mM L-alanin; 0,25 mM L-asparagin; 0,225 mM L- asparagovou kyselinu; 0,51 mM L-glutamovou kyselinu; 0,35 mM L-prolin a 4 mM L-glutamin. Do media bylo přidáváno také 10% (v/v) FCS a antibiotika (viz výše).

3.3.4.2. Kultivace primárních epiteliálních buněk

Jako nejvhodnější medium pro kultivaci buněk získaných pomocí “brushingu” se ukázalo být medium LHC-9 (Invitrogen-Gibco), které narozdíl od DMEM media obsahuje i důležité růstové faktory a další složky nezbytné pro růst, adheenci a množení buněk plicního epitelu.

Buňky získané “brushingem” byly tedy kultivovány v mediu LHC-9 doplněném o antibiotika (viz výše). V některých případech bylo medium doplněno ještě o antibiotika Ceftazidim Genim (4 µg/ml) a Meronem (8 µg/ml).

3.3.4.3. Pasážování buněk

Použité roztoky:

- 0,25% (w/v) trypsin
- 0,53 mM EDTA
- PBS-ELISA: 0,134 M NaCl; 1,8 mM Na₂HPO₄; 1 mM NaH₂PO₄; pH 7,2
- 20-50% (v/v) FCS

Postup:

Pasážování buněk probíhalo digesčním roztokem 0,25% (w/v) trypsinu s 0,53 mM EDTA v PBS-ELISA. Digesční roztok byl sterilizován přes mikrobiální filtr porozity 0,22 µm a následně přidán k adherentním buňkám v kultivační lahvičce, inkubace probíhala 5-10 min. v inkubátoru při 37 °C. Reakce byla zastavena přidáním 20-50% (v/v) FCS. Buněčná suspenze byla poté rozdělena do mikrozkušavek eppendorf a centrifugována na MicroCentaur (10 min., 3 000 RPM). Získané pelety buněk byly resuspendovány v příslušném kultivačním mediu a přeneseny do nové kultivační lahvičky nebo na destičku, případně zamraženy v mediu s 10% (v/v) DMSO nebo glycerolem.

3.3.5. Fluorescenční značení bakterií PA

Pro kvantifikaci *P. aeruginosa* v adhezních testech bylo potřeba bakterie *P. aeruginosa* fluorescenčně označit takovým činidlem, které neovlivní životaschopnost bakterií ani nebude modifikovat jejich povrchové struktury.

Spektrofluorimetrická měření se značenými bakteriemi *P. aeruginosa* byla zkoušena na různých typech destiček - černá CellBind (Corning, 96 jamek, dále značena jako destička A), bílá pro spektrofluorimetr Perkin Elmer (96 jamek, destička B), Polysorb (96 jamek, destička C). Pro tato měření byly testovány také různé přístroje - Perkin Elmer L 55, Varioscan Flash V7, Biotek Synergy 2 a Infinite M200 PRO.

3.3.5.1. Fluorescenční značení bakterií pomocí CellTracker

V případě barviva CellTracker Green CMFDA byl nejprve využit protokol doporučený výrobcem (Invitrogen) a následně byl testován i modifikovaný postup.

Použité roztoky:

- 10 mM zásobní roztok CellTracker v DMSO
- PBS-ELISA: 0,134 M NaCl; 1,8 mM Na₂HPO₄; 1 mM NaH₂PO₄; pH 7,2

Postup dle protokolu výrobce:

Rozpuštěním 50 µg CellTrackeru v 11 µl DMSO byl připraven 10 mM zásobní roztok CellTrackeru (CT). Ze zásobního roztoku CT byly dále připraveny pracovní roztok o koncentraci 10 µM v PBS-ELISA. K 1 ml pracovního roztoku CT bylo přidáno 50 µl bakteriální suspenze ($OD_{600nm} \sim 1,1$), vzorek byl dobře promíchán a inkubace probíhala 30 min. při 37°C. Po inkubaci bylo barvivo centrifugačně odděleno na MicroCentaur (10min., 13 000 RPM). Bakteriální peleta byla resuspendována v 1 ml PBS-ELISA temperovaného na 37°C a takto vzniklá suspenze byla ještě dalších 30 min. inkubována při 37°C. Následovalo opět promytí. Poté byl na podložní sklíčko připraven nátěr a mikroskopicky vyhodnocen pomocí fluorescenčního mikroskopu Nikon-Eclipse (excitační filtr 310001 FITC C87701).

Modifikovaný postup:

Naší snahou bylo, aby se barvivo CMFDA navázalo lépe dovnitř bakteriální buňky a mohla tak být pozorována žádaná fluorescence. Bylo testováno 5 různých uspořádání:

- 1) nedošlo ke změně, vzorek byl připraven stejně jako v návodu od výrobce
- 10 μ M roztok CT v PBS-ELISA a stejné množství bakteriální suspenze
- 2) došlo ke změně složení pracovního roztoku – 10 μ M roztok CT v PBS-ELISA s doplněním obsahu NaCl na 5% (w/v) a přidavkem 0,5 mM EDTA, pH upraveno na 8,5
- 3) došlo ke změně složení pracovního roztoku + „teplotní šok“ - pracovní roztok upraven jako u 2) navíc ještě bakterie byly vystaveny „teplotnímu šoku“ (inkubace 10 min. na ledu, poté dány do 37°C vodní lázně)
- 4) došlo ke změně složení pracovního roztoku + „teplotní šok“ + CaCl₂ - pracovní roztok upraven jako u 2), bakterie byly opět vystaveny „teplotnímu šoku“ a navíc po inkubaci ve 37°C opět inkubovány 15 min. na ledu s přidavkem CaCl₂, kde výsledná koncentrace roztoku byla 100 mM
- 5) bakterie byly nejdříve inkubovány 10 min. na ledu a poté centrifugovány na MicroCentaur (5 min., 10 000 RPM), peleta byla resuspendována v 0,5 ml 100 mM CaCl₂ a inkubována 15 min. na ledu, následovala opět centrifugace na MicroCentaur (5 min., 10 000 RPM) a poté byla získaná bakteriální peleta resuspendována v upraveném pracovním roztoku CT.

Takto ošetřené vzorky byly inkubovány 30 min. při 37°C, poté bylo barvivo centrifugačně odděleno na MicroCentaur (10 min., 13 000 RPM). Bakteriální pelety byly přeneseny do nového kultivačního media PS a kultivovány přes noc při 37°C za stálého třepání. Druhý den byly bakterie centrifugovány na MicroCentaur (10 min., 13 000 RPM) a z pelet byly připraveny nátěry a zavěšené kapky na podložní sklíčka pro mikroskopické vyhodnocení. Mikroskopické vyhodnocení bylo provedeno pomocí fluorescenčního mikroskopu Nikon-Eclipse (excit. filtr 31001 FITC C87701).

3.3.5.2. Fluorescenční značení bakterií pomocí resazurinu

Použité roztoky:

- zásobní roztok resazurinu v PBS-ELISA o koncentraci 100 µg/ml
- PBS-ELISA: 0,134 M NaCl; 1,8 mM Na₂HPO₄; 1 mM NaH₂PO₄; pH 7,2

Postup:

Pro značení touto látkou byla využita metoda dle [49].

K bakteriální suspenzi kultivované v PS mediu byl přidán zásobní roztok resazurinu v PBS-ELISA (100 µg/ml) v poměru 1:9 dílů na bakteriální suspenzi. Takto vzniklá směs byla promíchána a inkubována při 37°C za stálého třepání. Z inkubační směsi byly odebírány vzorky vždy po 1 ml v časech 0, 2, 4, 6 a 8 hodin. Přebytek resazurinu byl odstraněn centrifugací na MicroCentaur (10 min., 13 000 RPM) a pelety byly přeneseny do PBS-ELISA. Byly připraveny nátěry na podložní sklíčka pomocí mikrobiologické kličky, nátěry byly fixovány několikerým protažením plamenem. Na základě mikroskopického pozorování byl určen optimální čas inkubace. Kromě mikroskopického vyhodnocení byla měřena i fluorescence bakterií pomocí spektrofotometru Perkin Elmer L55 (program FL WinLab, metoda wpr, excitační vlnová délka 530 nm, emisní vlnová délka 585 nm) a sledována závislost fluorescence na koncentraci bakterií na různých typech destiček – destička A (černá CellBind, 96 jamek) a destička B (bílá pro Perkin Elmer, 96 jamek).

3.3.5.3. Fluorescenční značení bakterií pomocí FITC

Použité roztoky:

- uhličitanový pufr: 0,1 M NaCl; 50 mM Na₂CO₃; pH 9,5 (upraveno HCl)
- zásobní roztok FITC: 1 mg/ ml FITC v uhličitanovém pufru
- borátový pufr: 20 mM H₃BO₃; 150 mM NaCl; pH 9 (upraveno NaOH)
- zásobní roztok FITC: 1 mg/ ml FITC v borátovém pufru
- PBS-ELISA: 0,134 M NaCl; 1,8 mM Na₂HPO₄; 1 mM NaH₂PO₄; pH 7,2
- PBS+Hepes: PBS-ELISA (viz výše) s 20 mM HEPES; pH 7,2

Postup:

Bakterie PA kultivované přes noc při 37°C za stálého třepání byly centrifugačně promyty od kultivačního PS media na centrifuze MicroCentaur (10 min., 13 000 RPM). Byly zkoušeny tři různé způsoby značení bakterií pomocí FITC:

- 1) vzorek 1- bakterie v 1 ml uhličitanového pufru s 0,1 mg/ml FITC
- 2) vzorek 2- bakterie v 1 ml PBS-ELISA s přídavkem 100 µl zásobního roztoku FITC v uhličitanovém pufru

Takto připravené vzorky 1) a 2) byly inkubovány 1 hod. při 37°C, následovalo vymytí čínidla centrifugací na MicroCentaur (10 min., 7 000 RPM). Bakteriální peleta byla resuspendována v PBS-ELISA. Centrifugační promytí v PBS-ELISA bylo provedeno 3x.

- 3) vzorek 3- bakterie byly značeny pomocí FITC postupem uvedeným v práci [50]:

Získané bakteriální pelety byly resuspendovány v 8 ml borátového pufru a centrifugovány na MicroCentaur (10 min., 10 000 RPM), toto centrifugační promytí bylo provedeno 2x. Poté byly bakterie resuspendovány v 1 ml borátového pufru a k suspenzi bylo přidáno 200 µl zásobního roztoku FITC v borátovém pufru. Takto vzniklá suspenze byla inkubována 30 min. při 23°C. Po inkubaci bylo k suspenzi přidáno 5 ml 6% BSA v PBS-ELISA, aby došlo k navázání zbylého

FITC a suspenze byla centrifugována na MicroCentaur (15 min., 10 000 RPM). Bakteriální peleta byla resuspendována v PBS+Hepes a znovu centrifugována na MicroCentaur (10 min., 10 000 RPM), toto centrifugační promytí bylo provedeno 2x.

Z takto připravených bakteriálních suspenzí vzorků 1), 2) a 3) byly udělány pomocí mikrobiologické kličky nátěry na podložní sklíčka a pokus byl mikroskopicky vyhodnocen na mikroskopu Nikon-Eclipse (excit. filtr 31001 FITC C87701). Vyhodnocení pokusu bylo provedeno i spektrofotometricky na přístroji Infinite M200 PRO.

3.3.5.4. Fluorescenční značení bakterií pomocí PKH 26

V případě barviva PKH 26 (Sigma – PKH 26 Red Fluorescent Cell Linker Mini Kit) bylo barvení provedeno podle protokolu doporučeného výrobcem.

Použité roztoky:

- PKH 26 Red Fluorescent Cell Linker Kit : PKH 26 Cell Linker (1mM) v ethanolu; Diluent C
- roztok BSA: 1% (w/v) BSA fraction V v PBS-ELISA
- PBS-ELISA: 0,134 M NaCl; 1,8 mM Na₂HPO₄; 1 mM NaH₂PO₄; pH 7,2

Postup:

Bakterie PA kultivované přes noc při 37°C za stálého třepání byly centrifugačně promyty od kultivačního media na centrifuze MicroCentaur (10 min., 13 000 RPM). Byla připravena bakteriální suspenze v Diluentu C o koncentraci $6 \cdot 10^8$ b/ml. Ke 250 µl bakteriální suspenze bylo přidáno 250 µl barviva PKH 26 v Diluentu C o koncentraci 20 nebo 40 µM. Získaná směs byla promíchána a inkubována. Zkoušeny byly čtyři různé doby inkubace – 5, 20, 30 a 60 min., které probíhaly za laboratorní teploty. Inkubace byla zastavena přidavkem 100 µl 1% BSA. Po prvním přidavku 1% BSA a krátké inkubaci s ním, bylo přidáno ke směsi ještě dalších 1,2 ml 1% BSA. Směs byla centrifugována na centrifuze MicroCentaur (10 min., 13 000 RPM) a pelety poté resuspendovány v PBS-ELISA. Byly připraveny nátěry na podložní sklíčka. Pokus byl vyhodnocen mikroskopicky na mikroskopu Nikon-Eclipse (excit. filtr 31002 Rdil C87702) i pomocí spektrofleurimetru, kde byla sledována závislost fluorescence na koncentraci bakterií. Spektrofleurimetrická měření byla provedena na čtyřech různých přístrojích: Perkin Elmer L55, Varioscan Flash V7, Biotek Synergy 2 a Infinite M200 PRO.

3.3.6. Fluorescenční značení buněk A549

Pro adhezní testy bakterií *P. aeruginosa* na buňky plicního epitelu bylo potřeba získat fluorescenčně značené jak bakterie *P. aeruginosa*, tak buňky plicního epitelu. Pro nalezení vhodného barviva a optimálního protokolu barvení byly nejprve použity epiteliální buňky linie A549.

3.3.6.1. Fluorescenční značení buněk A549 pomocí CellTracker

Použité roztoky:

- PBS-ELISA: 0,134 M NaCl; 1,8 mM Na₂HPO₄; 1 mM NaH₂PO₄; pH 7,2
- pracovní roztok CellTracker v PBS-ELISA o koncentraci 5 a 10 µM

Postup:

Kultivace buněk A549 v DMEM mediu s přidavkem dalších složek (viz kap. 3.3.4.1) na třech různých destičkách - černá CellBind (A), bílá destička pro spektrofleurimetr Perkin Elmer (B) a Polysorb (C), trvala přibližně 7 dní. Po úspěšné kultivaci, kdy bylo dosaženo tvorby jednotné vrstvy, tzv. „monolayer“, bylo odpipetováno kultivační medium a přidán pracovní roztok CellTrackeru v PBS-ELISA, na jednu jamku bylo odměřeno 100 µl pracovního roztoku barviva CT. Zkoušeny byly tři doby inkubace - 15, 30 a 45 min. a dvě různé koncentrace pracovního roztoku - 5 a 10 µM. Inkubace probíhala v inkubátoru při 37 °C. Po inkubaci byl roztok barviva CT odpipetován a k buňkám bylo přidáno nové kultivační medium DMEM bez přidavku FCS (předem vytemperované na 37 °C). Buňky byly s novým mediem inkubovány 30 min. a poté jednou promyty PBS-ELISA. Vyhodnocení pokusu bylo provedeno pomocí mikroskopu Nikon-Eclipse (excit. filtr 31001 FITC C87701).

3.3.6.2. Fluorescenční značení buněk A549 pomocí PKH 26

Použité roztoky:

- směs pro pasáž: 0,53 mM EDTA; 0,25 % (w/v) trypsin v PBS-ELISA
- 20-50% FCS
- PKH 26 Red Fluorescent Cell Linker Kit : PKH 26 Cell Linker (1mM) v ethanolu; Diluent C
- roztok BSA: 1% (w/v) BSA fraction V v PBS-ELISA
- zásobní roztok trypanové modři: 4 mg/ml v PBS-ELISA

Postup:

Buňky linie A549 byly kultivovány v DMEM mediu s přidavkem dalších složek (viz kap. 3.3.4.1.) v kultivační lahvičce přibližně 9-11 dní. Poté byly buňky pasážovány (viz kap. 3.3.4.3.). Buněčné pelety byly resuspendovány v 1 ml DMEM media a centrifugovány na MicroCentaur (10 min., 3 000 RPM), tím byly promyty od FCS.

Byl připraven roztok barviva PKH 26 v Diluentu C – 4 µl barviva PKH 26 v 1 ml Diluentu C. K získaným buněčným peletám v mikrozkuvkách eppendorf bylo přidáno ke každé nejdříve 250 µl Diluentu C a poté 250 µl připraveného roztoku barviva PKH 26 v Diluentu C. Zkoušeny byly čtyři různé doby inkubace - 2, 5, 10 a 20 min., které probíhaly za laboratorní teploty. Inkubace byla zastavena přidáním 500 µl 1% BSA a po krátké 1-2 min. inkubaci s 1 % BSA byl přidán 1 ml DMEM media s 10% FCS. Takto získané suspenze byly centrifugovány na MicroCentaur (10 min., 3 000 RPM). Následně byly získané pelety resuspendovány v 1 ml DMEM media s 10% FCS a opět centrifugovány na MicroCentaur (10 min., 3 000 RPM). Centrifugační promytí bylo provedeno 2x. Poté byly buněčné pelety resuspendovány ve 200 µl PBS-ELISA a ze získaných buněčných suspenzí byly na podložní sklíčka naneseny kapky (20 µl). Pro zjištění životnosti buněk bylo vyzkoušeno i barvení pomocí trypanové modři (viz kap. 3.3.1.2.). Pokus byl vyhodnocen mikroskopicky. Dále byla také ověřována perzistence PKH 26 v buňkách A549. Značené buňky byly aplikovány na destičku A (CellBind, 96 jamek) a kultivovány v DMEM mediu jako obvykle (viz kap. 3.3.4.). Během kultivace byla přímo na destičce sledována jejich fluorescence na mikroskopu Nikon-Eclipse (excit. filtr 31002 RdiI C87702).

3.3.7. Adhezní testy

Při adhezních testech provedených nejprve dle práce [50] byla sledována adheze bakterií *Pseudomonas aeruginosa* značených pomocí FITC na buňky linie A549, které zde byly využity jako modelový systém plicního epitelu.

Použité roztoky:

- PBS-S: PBS-ELISA (viz kap. 3.3.6.1.) s 1 mM CaCl_2 ; 2 mM MgCl_2 ; 20 mM HEPES; pH 7,2
- 10% (v/v) formaldehyd v destilované vodě
- zásobní roztok L-fukosy: 10 mg/ ml v PBS-S
- 1% (w/v) roztok Giemsa v destilované vodě

Postup:

Buňky linie A549 byly kultivovány v DMEM mediu s přidavkem dalších složek (viz kap. 3.3.4.1.) na destičce A (CellBind, 96 jamek) 7-10 dní. Byly připraveny bakterie *P. aeruginosa* značené pomocí FITC (viz kap. 3.3.5.3.) . Na rozdíl od práce [50] byla zkoušena i varianta adhezních testů se značenými bakteriemi PA pomocí FITC a zároveň značenými buňkami linie A549 pomocí PKH 26 (viz kap. 3.3.6.2.).

Mono vrstva buněk A549 byla 3x promyta PBS-S předem temperovaným na 37°C a následně tímto roztokem i převrstvena - 100 μl PBS-S na jamku. Do každé jamky s buňkami A549 v PBS-S bylo poté přidáno ještě 100 μl bakteriální suspenze značené FITC s klesající koncentrací (ředěno dvojkovou řadou), nebo 100 μl bakteriální suspenze značené FITC spolu s L-fukosou (o koncentraci 1 mg/ml nebo 0,2 mg/ml) či protilátkou 4.3.D (specifickou protilátkou proti lektinu PA-IIL, 100 $\mu\text{g/ml}$). Takto připravené směsi byly inkubovány 60 min. při 37°C za mírného třepání (70 RPM). Po skončení inkubace byly neadherované bakterie odstraněny čtyřnásobným promytím vychlazeným PBS-S. Pokus byl vyhodnocen pomocí spektrofotometru Infinite M200 PRO. Následovala fixace 10% (v/v) formaldehydem po dobu 30 min., PBS-S bylo odpipetováno a do každé jamky bylo přidáno 150 μl 10% formaldehydu. Po zafixování byly jamky opláchnuty destilovanou vodou a buňky barveny pomocí barviva Giemsa. Barvení trvalo 10-15 min. a jamky byly znovu 3x promyty destilovanou vodou.

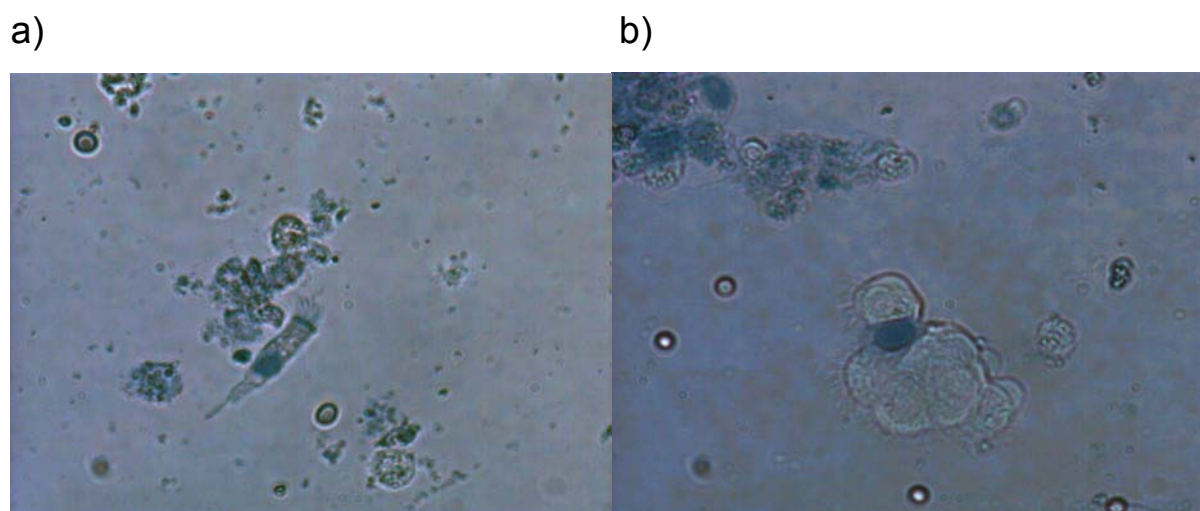
4. Výsledky

4.1. Izolace buněk plicního epitelu

Buňky byly získávány od pacientů s CF ve spolupráci s FN Motol. Jako modelový systém byly využívány buňky linie A549.

4.1.1. Izolace buněk získaných pomocí metody „brushing“

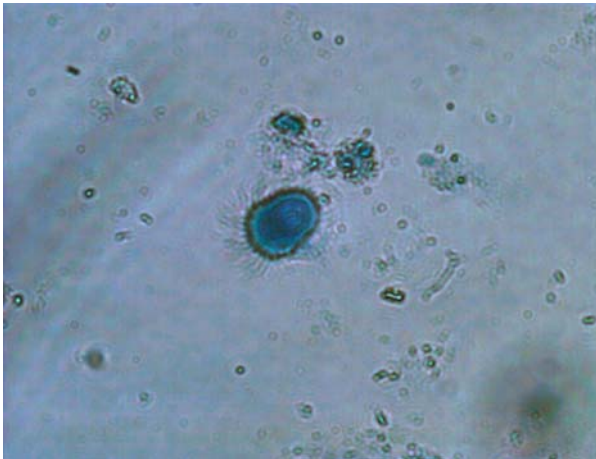
Princip této metody je popsán v kap. 3.3.3.1. Jde o šetrnější způsob získávání plicních epiteliálních buněk než je izolace přímo z plicní tkáně. Touto metodou bylo získáno 6 vzorků od pacientů s CF značené Hu 1-6 a také 2 vzorky od zdravých jedinců značené Hu-Z 1-2. Pro zjištění životnosti buněk bylo provedeno barvení pomocí trypanové modři (viz kap. 3.3.1.2.), viz obr. 6. Viabilita buněk se pohybovala v rozmezí 50-80%. Morfologie buněk byla sledována pomocí barvení Giemsa (viz kap. 3.3.1.1.), obr. 7.



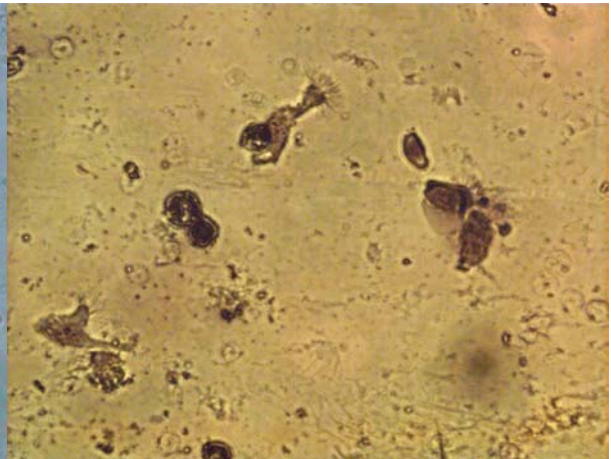
Obr. 6: Buňky získané pomocí „brushingu“ po vitálním barvení trypanovou modří.

- a) Zachycuje buňky z Hu 4, jsou zde vidět typické buňky epitelu, dobře patrná je i ciliární buňka.
- b) Zobrazuje buňky z Hu 6, viditelný je agregát zatím nepřisedlých buněk epitelu.
(Nikon 1500x)

a)



b)



Obr. 7: Buňky získané pomocí „brushingu“ barvené pomocí Giemsa.

- a) Zachycuje buňky z Hu 4, je zde vidět typická ciliární buňka.
- b) Zobrazuje buňky z Hu 6, jsou zde vidět opět typické buňky plicního epitelu (Nikon 1500x).

Odlišné zabarvení pozadí u pořízených snímků je dáno nestejným vyvážením na mikroskopu Nikon-Eclipse.

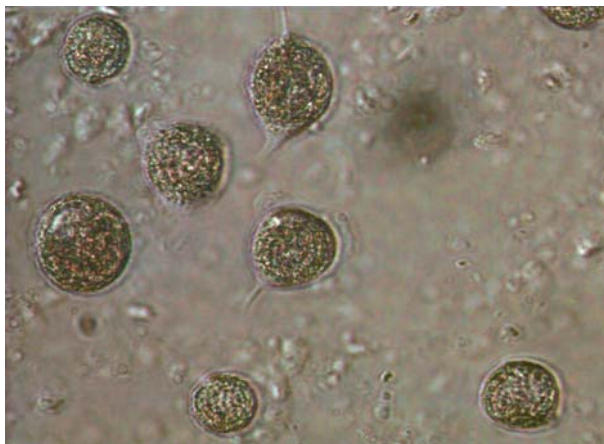
4.2. Kultivace buněk plicního epitelu

Kultivace buněk získaných pomocí „brushingu“ a kultivace buněk linie A549 je podrobněji popsána v kap. 3.3.4. Buňky linie A549 ochotně přisedají k povrchu a rychle se dělí, konfluentní vrstvy bylo většinou dosaženo po týdnu kultivace. U buněk získaných „brushingem“ docházelo i přes používání ATB k přemnožení bakterií či plísní (kontaminace pocházející často od dárce).

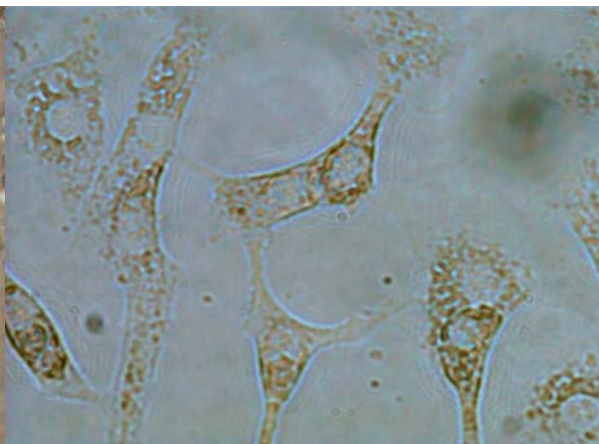
4.2.1. Kultivace buněk linie A549

Kultivace buněk linie A549 probíhala v DMEM mediu s přidavkem dalších složek (viz kap. 3.3.4.1.) v kultivační lahvičce či na destičce bez modifikace povrchu. Průběh kultivace buněk A549 je zachycen na obr. 8.

a)



b)



Obr. 8: Průběh kultivace buněk linie A549.

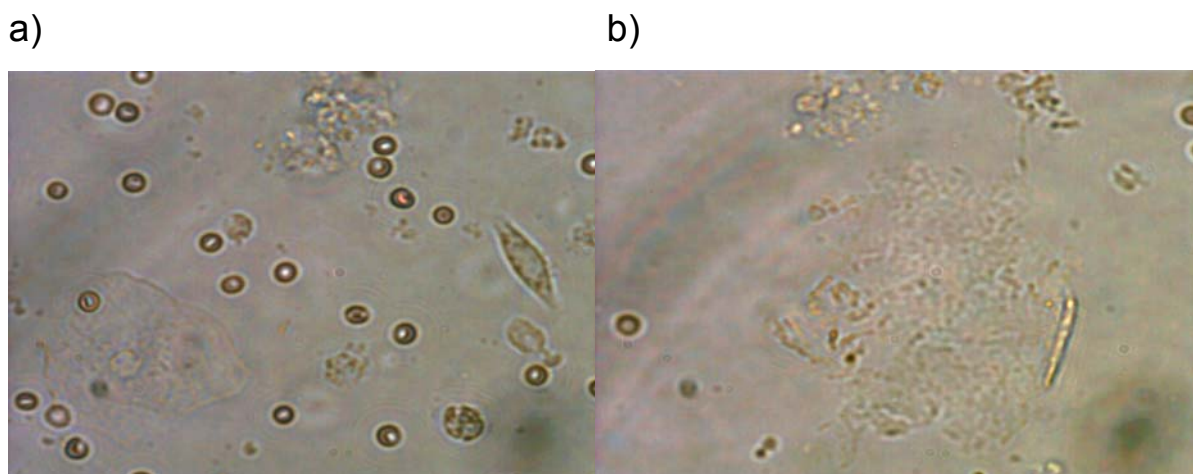
- a) Zachycuje buňky A549 v 1. dnu kultivace v DMEM mediu.
- b) Zobrazuje buňky A549 v 5. dnu kultivace v DMEM mediu, kde je již patrný počátek tvorby souvislé vrstvy - tzv. „monolayer“ (Nikon, 1500x).

4.2.2. Kultivace primárních epiteliálních buněk

Kultivace primárních epiteliálních buněk (získaných pomocí „brushingu“) probíhala v LHC-9 mediu. Do LHC-9 media byla přidávána také ATB (viz kap. 3.3.4.).

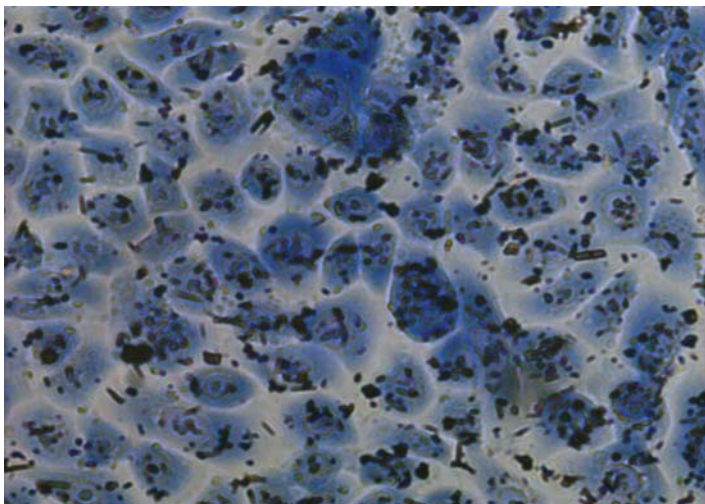
Typický obraz z různých úseků kultivace buněk získaných pomocí „brushingu“ je znázorněn na obr. 9. Po delším čase kultivace byly již primární epiteliální buňky adherované na povrch a na mikroskopu nebyly viditelné.

Kromě kultivací ve speciálních kultivačních lahvičkách (12,5 cm², 25 cm², 75 cm²), byly testovány také kultivační lahvičky potažené různými povrchy – kolagen typ I (3 µg/cm²), fibronectin (2 µg/cm²), poly-L-lysin (1 mg/ml), L-lysin (1 M roztok) a želatina (1 mg/ml). Jako nejvhodnější se však zdá být kultivace primárních epiteliálních buněk v kultivační lahvičce bez modifikace povrchu, viz obr. 10.



Obr. 9: Průběh kultivace buněk plicního epitelu získaných pomocí „brushingu“.

- a) Zachycuje buňky ve 3. dnu kultivace v LHC-9 mediu, jsou zde zachyceny typické buňky plicního epitelu a je zde viditelné i větší množství erytrocytů.
- b) Zobrazuje buňky po týdnu kultivace v LHC-9 mediu (Nikon, 1500x).



Obr. 10: Buňky plicního epitelu získané pomocí „brushingu“ z Hu 1 po třech týdnech kultivace v kultivační lahvičce bez modifikace povrchu barvené pomocí barviva Giemsa (Nikon, 1500x).

4.3. Fluorescenční značení bakterií PA

Pro studium adheze bakterií *P. aeruginosa* na buňky plicního epitelu bylo potřeba nalézt vhodný způsob kvantifikace bakterií. Jednou z možností je využití fluorescenčního značení a detekce fluorescence pomocí fluorescenčního mikroskopu a spektrofotometru.

4.3.1. Fluorescenční značení bakterií pomocí CellTracker

CellTracker Green CMFDA je fluorescenční barvivo volně pronikající přes buněčné membrány, schopné reagovat s intracelulárními strukturami buněk. Uvádí se, že viabilita označených buněk je nejméně 24 hod. [51].

Excitační maximum má tato sloučenina při 492 nm a emisní maximum při 517 nm.

Postup značení je popsán v kap. 3.3.5.1. Postup dle návodu od výrobce (Invitrogen) nevedl k žádané fluorescenci, bylo proto přistoupeno k modifikaci postupu. Naší snahou bylo, aby barvivo proniklo efektivněji do bakteriální buňky a mohla tak být pozorována fluorescence. Ale ani pomocí upraveného postupu požadované fluorescence bakterií dosaženo nebylo. Pokus byl vyhodnocován mikroskopicky pomocí fluorescenčního mikroskopu Nikon-Eclipse (excit. filtr 31001 FITC C87701). Byla pozorována pouze fluorescence o velmi malé intenzitě blízke pozadí. Pro značení bakterií *P. aeruginosa* byla tato sloučenina vyhodnocena jako nevhodná.

4.3.2. Fluorescenční značení bakterií pomocí resazurinu

Resazurin je redoxní barvivo, které je redukováno živými bakteriálními buňkami na fluoreskující resorufin. Touto sloučeninou lze tedy také stanovit viabilitu buněk, neboť mrtvé buňky rychle ztrácejí metabolickou kapacitu, a tudíž neposkytují fluorescenční signál [49].

Excitační maximum má tato sloučenina při 530 nm a emisní maximum při 585 nm.

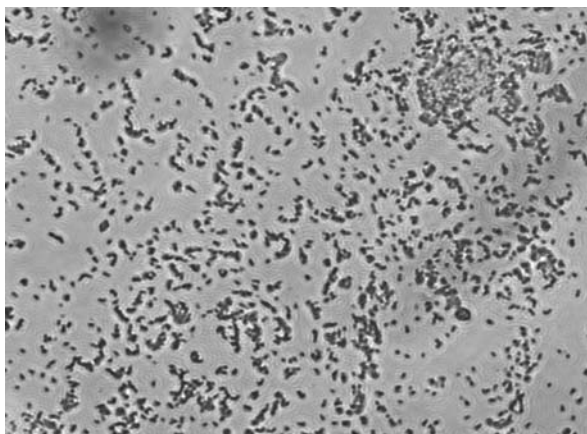
Postup značení tímto barvivem je popsán v kap. 3.3.5.2.

K bakteriální suspenzi (optimálně v exponenciální fázi růstu) byl přidán zásobní roztok resazurinu (100 µg/ml). Byly zkoušeny různé doby inkubace resazurinu s bakteriální suspenzí - byly odebírány vzorky suspenze v čase 2, 4, 6 a 8 hod. Z těchto vzorků byly připraveny nátěry na podložní sklíčka. Pokus byl vyhodnocen mikroskopicky pomocí fluorescenčního mikroskopu Nikon-Eclipse (excit. filtr 31002 RdiI C87702).

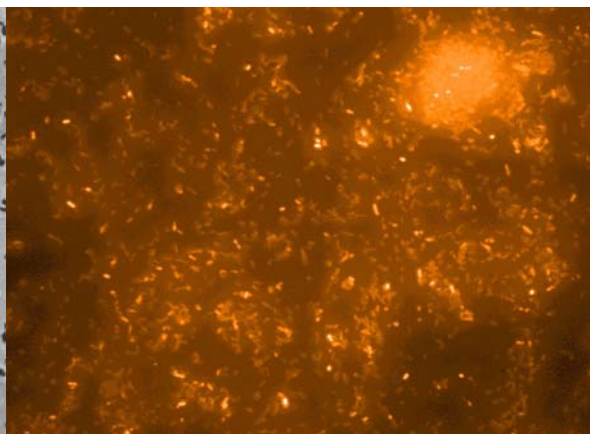
Ze získaných výsledků byl jako optimální čas inkubace určen čas 6 hod., kdy byla fluorescence bakterií *P. aeruginosa* již dostatečně intenzivní (viz obr. 11).

Po inkubacích trvajících méně než 6 hod. sice bakterie *P. aeruginosa* vykazovaly fluorescenci, ale jen o velmi malé intenzitě.

a)



b)



Obr. 11: Bakterie PA značené pomocí resazurinu. Doba inkubace byla 6 hod.

a) záznam z mikroskopu ve viditelné oblasti světla

b) snímek zachycující fluorescenci v téže oblasti preparátu (Nikon, 1500x).

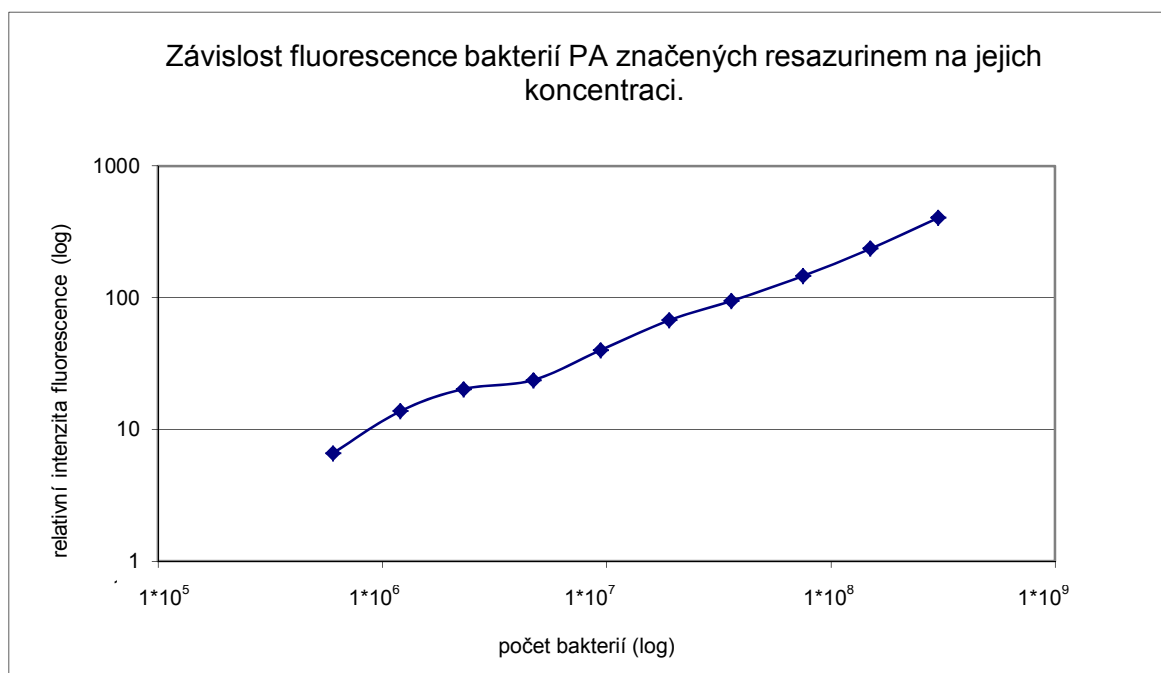
Kromě mikroskopického vyhodnocení byla měřena také fluorescence bakterií na spektrofotometru Perkin Elmer L55. Byla sledována závislost fluorescence na koncentraci bakterií, vliv centrifugace a typu mikrotitračních destiček. Byly vyzkoušeny dva typy destiček - A (CellBind, 96 jamek) a B (bílá pro spektrofotometr Perkin Elmer, 96 jamek).

Základní bakteriální suspenze o koncentraci $6 \cdot 10^8$ b/ml byla ředěna dvojkovou řadou. Destička byla centrifugována na centrifuze Eppendorf 5430 (2 min., 2 000g). Centrifugace byla provedena za účelem, abychom zjistili zda-li je lepší bakteriální suspenze nebo sediment bakterií v jamce. Podle dat uvedených v tabulce 1 je vidět, že lepší je bakteriální suspenze, fluorescence bakterií po centrifugaci neklesá v závislosti na ředění, ale jsou zde výkyvy. Uvedená data jsou zpracována z hodnot získaných při měření na destičce B. V případě destičky A získána data nebyla reprodukovatelná. Nevýhodou destičky A je navíc nižší citlivost. Výsledky získané při měření na destičce B jsou shrnuty v tabulce 1.

Tabulka 1: Data získaná měření na destičce B na spektrofotometru Perkin Elmer.

Ředění základ. suspenze	Koncentrace bakterií (b/ml)	Fluorescence bakterií (bez odečtení slepého vzorku)	Fluorescence bakterií (po odečtení slepého vzorku)	Fluorescence bakterií po centrifugaci (bez odečtení slepého vzorku)	Fluorescence bakterií po centrifugaci (po odečtení slepého vzorku)
2x	$3,0 \cdot 10^8$	705,787	402,416	655,208	405,960
4x	$1,5 \cdot 10^8$	538,554	235,183	491,560	242,312
8x	$7,5 \cdot 10^7$	449,034	145,663	400,330	151,082
16x	$3,6 \cdot 10^7$	397,822	94,451	357,994	108,746
32x	$1,9 \cdot 10^7$	370,687	67,316	345,093	95,845
64x	$9,4 \cdot 10^6$	343,323	39,952	271,182	21,934
128x	$4,7 \cdot 10^6$	327,026	23,655	280,059	30,811
256x	$2,3 \cdot 10^6$	323,581	20,210	283,155	33,907
512x	$1,2 \cdot 10^6$	317,091	13,720	276,588	27,340
1024x	$0,6 \cdot 10^6$	309,943	6,572	250,080	0,832
slepý vzorek	PBS-ELISA	303,371		249,25	

Ze získaných dat je zřejmé, že závislost fluorescence na koncentraci není lineární, ale vyšší koncentraci bakterií odpovídá i vyšší fluorescence (viz obr. 12).



Obr. 12: Grafické znázornění závislosti fluorescence bakterií PA značených pomocí resazurinu na jejich koncentraci. Základní bakteriální suspenze o koncentraci $6 \cdot 10^8$ b/ml byla ředěna dvojkovou řadou. Hodnoty v grafu jsou získané z přístroje Perkin Elmer L55 a odpovídají měřením na destičce B po odečtení slepého vzorku. Relativní směrodatná odchylka se pohybovala v rozmezí 10-13%.

4.3.3. Fluorescenční značení bakterií pomocí FITC

Fluorescein-isothiokyanát (FITC) je jednou z nejčastěji využívaných sloučenin pro fluorescenční značení. Tato chemicky reaktivní sloučenina kovalentně modifikuje primární aminoskupiny. Excitační maximum má při 495 nm a emisní maximum při 521 nm.

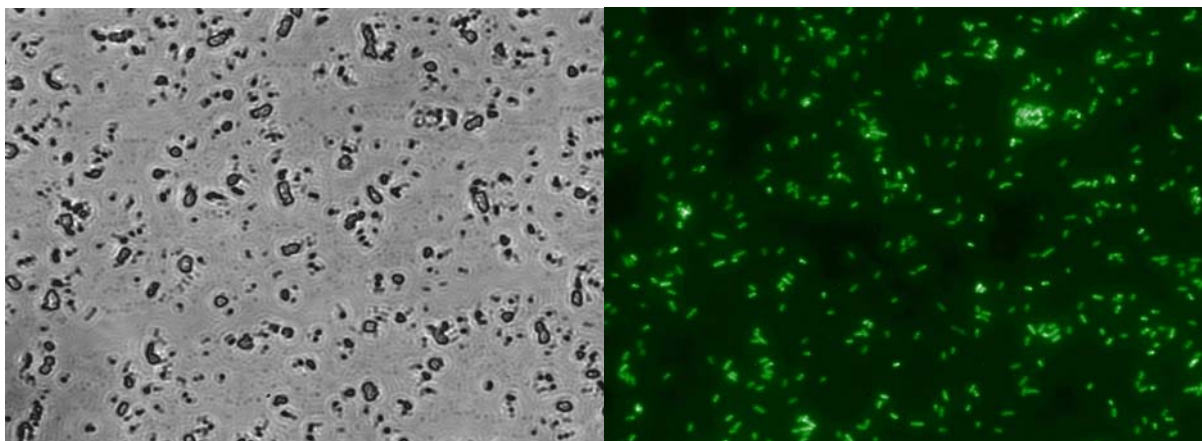
Postup značení touto sloučeninou je popsán v kap. 3.3.5.3. Byly zkoušeny tři různé způsoby značení bakterií pomocí FITC. Vyhodnocení vzorků 1), 2) a 3) bylo provedeno na mikroskopu Nikon-Eclipse (excit. filtr 31001 FITC C87701).

Z pořízených snímků je vidět, že fluorescence bakterií PA značených FITC byla prokázána u všech tří vzorků (viz obr. 13, 14, 15). U vzorku 1 je však fluorescence bakterií PA nejintenzivnější a je zde nejvýhodnější odstup signálu od pozadí. Proto s tímto vzorkem byla kromě mikroskopického vyhodnocení měřena také fluorescence bakterií na spektrofluorimetru Infinite M200 PRO (viz obr. 16). Je zde jasně patrná korelace mezi fluorescencí a koncentrací bakterií PA značených pomocí FITC.

Základní bakteriální suspenze $1 \cdot 10^8$ b/ml byla ředěna dvojkovou řadou.

a)

b)

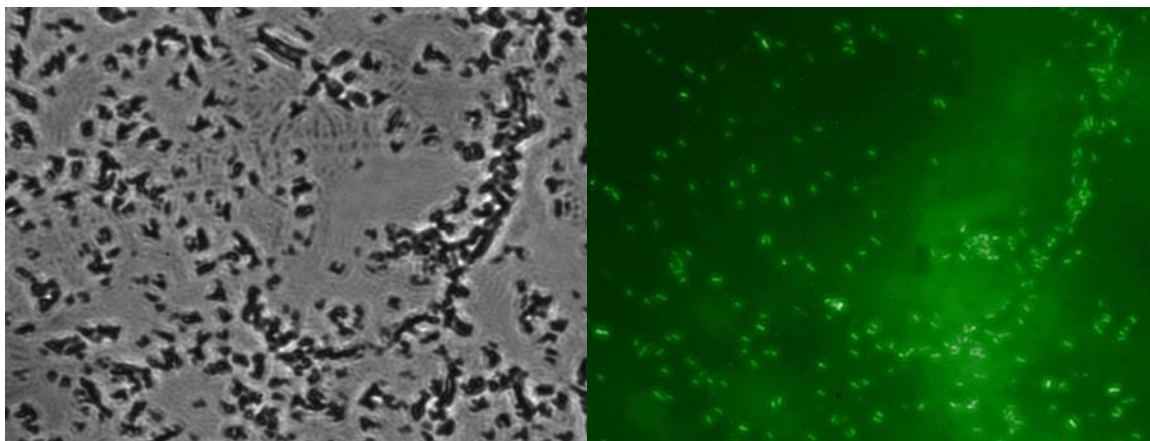


Obr. 13: Bakterie PA značené pomocí FITC (vzorek 1).

- a) záznam z mikroskopu ve viditelné oblasti světla
- b) snímek zachycující fluorescenci v téže oblasti preparátu (Nikon, 1500x).

a)

b)



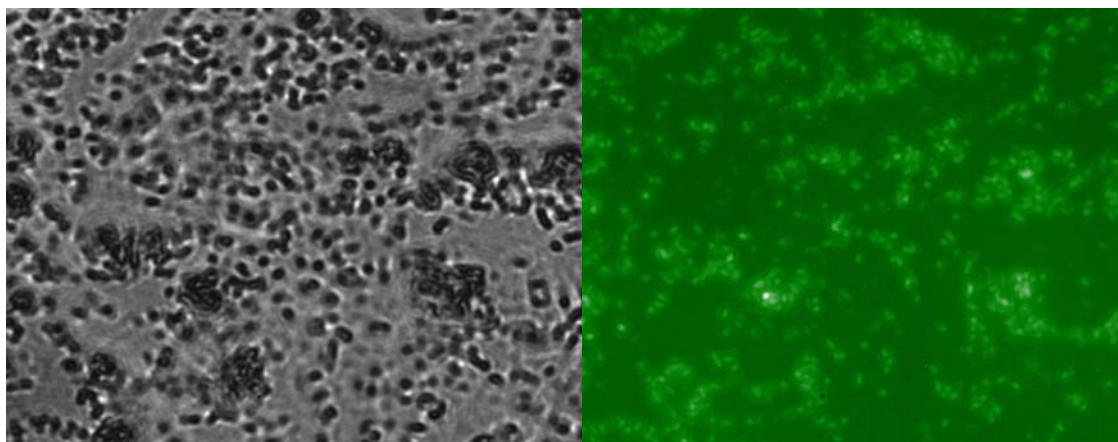
Obr. 14: Bakterie PA značené pomocí FITC (vzorek 2).

a) záznam z mikroskopu ve viditelné oblasti světla

b) snímek zachycující fluorescenci v téže oblasti preparátu (Nikon, 1500x).

a)

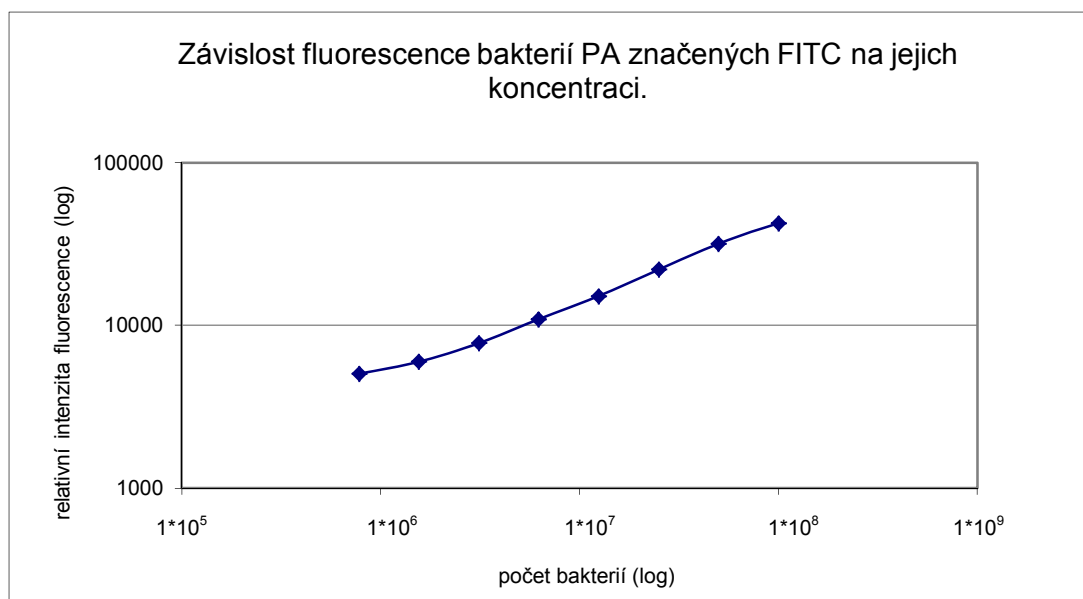
b)



Obr. 15: Bakterie PA značené pomocí FITC (vzorek 3).

a) záznam z mikroskopu ve viditelné oblasti světla

b) snímek zachycující fluorescenci v téže oblasti preparátu (Nikon, 1500x).



Obr. 16: Grafické znázornění závislosti fluorescence bakterií PA značených pomocí FITC (vzorek 1) na jejich koncentraci. Základní bakteriální suspenze o koncentraci $1 \cdot 10^8$ b/ml byla ředěna dvojkovou řadou. Hodnoty v grafu jsou získané z přístroje Infinite M200 PRO. Relativní směrodatná odchylka byla v rozmezí 9-11%.

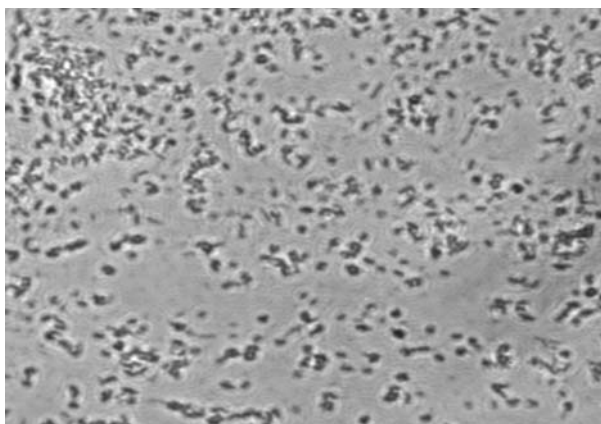
4.3.4. Fluorescenční značení bakterií pomocí PKH 26

PKH 26 je sloučenina vázající se do buněčné membrány. Excitační maximum má tato sloučenina při 551 nm a emisní maximum při 567 nm.

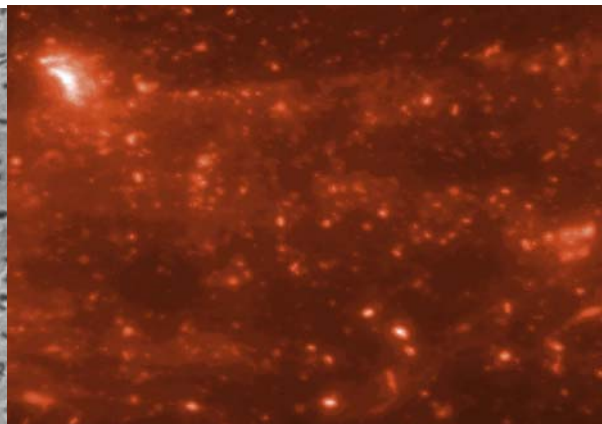
Postup značení tímto barvivem je popsán v kap. 3.3.5.4. Byly zkoušeny různé délky inkubace PKH 26 s bakteriální suspenzí - 5, 20, 30 a 60 min.

Z jednotlivých vzorků byly připraveny nátěry na podložní sklíčka a byla také ověřována viabilita pozorováním v kapce.. Pokus byl vyhodnocen mikroskopicky pomocí fluorescenčního mikroskopu Nikon-Eclipse (filtr 31002 Rdi C87702). Bakterie byly i po označení životaschopné. Bakterie PA inkubované s barvivem PKH 26 po dobu 5 a 20 min. sice vykazovaly fluorescenci, ale ve velmi malé intenzitě blízké pozadí. Bakterie inkubované s činidlem 60 min. vykazovaly fluorescenci téměř shodné intenzity jako bakterie inkubované 30 min. Ze získaných výsledků byl tedy jako optimální čas inkubace určen čas 30 min. (viz obr. 17).

a)



b)



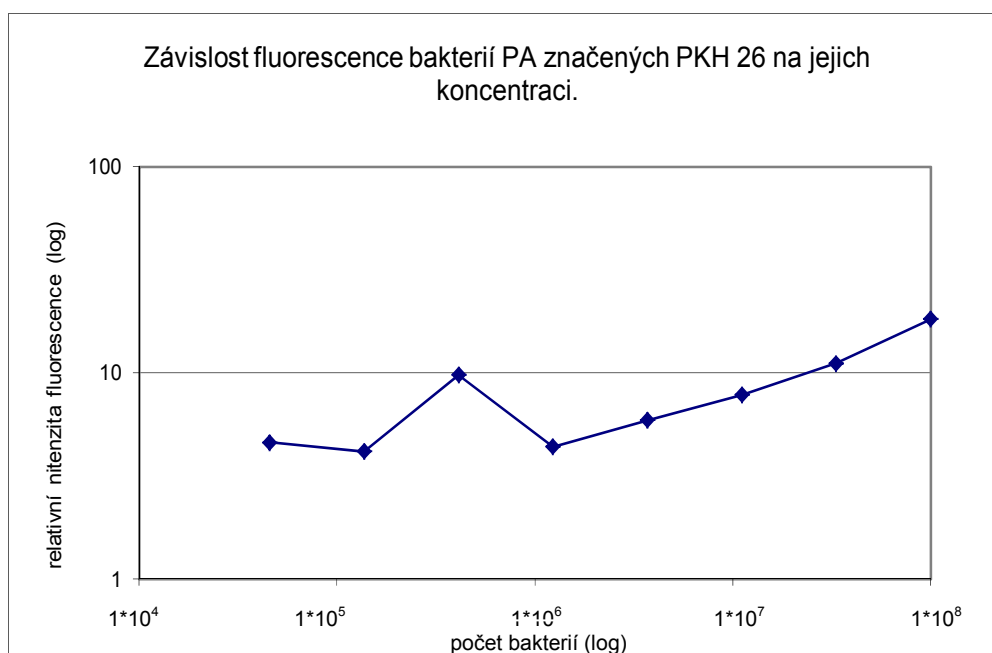
Obr. 17: Bakterie PA značené pomocí PKH 26. Doba inkubace byla 30 min.

a) záznam z mikroskopu ve viditelné oblasti světla

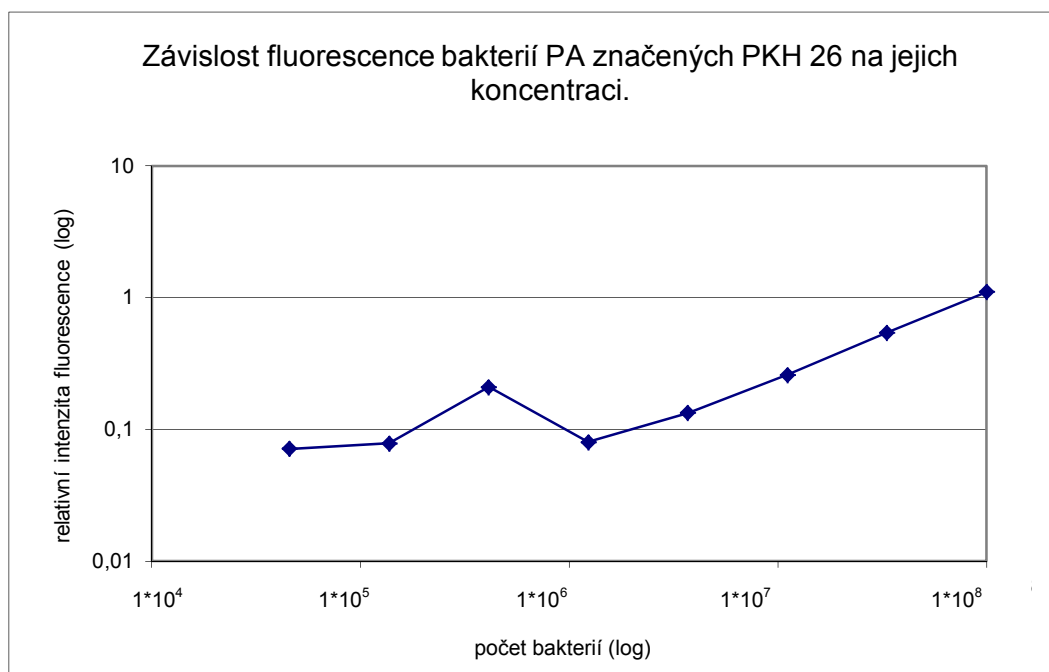
b) snímek zachycující fluorescenci v téže oblasti preparátu (Nikon, 1500x)

Kromě mikroskopického vyhodnocení byla měřena také fluorescence bakterií na spektrofotometru Perkin Elmer L55. Tento přístroj se ale pro tyto účely ukázal jako nevyhovující, byla proto vyzkoušena měření i na přístrojích Varioscan Flash V7 (viz obr. 18 a 19) a Biotek Synergy 2 (viz obr. 20 a 21). Byla sledována závislost fluorescence na koncentraci bakterií a také byly pozorovány dva typy destiček - A (CellBind, 96 jamek) a B (bílá pro spektrofotometr Perkin Elmer, 96 jamek). Základní bakteriální suspenze o koncentraci $1 \cdot 10^8$ b/ml byla ředěna trojkovou řadou. Odchylky v případě ředění 729x jsou pravděpodobně způsobeny nepřesností při pipetování.

Ze získaných dat pomocí přístroje Varioscan Flash V7 se jako nejvhodnější zdá destička B (viz obr. 18). Jistá korelace mezi fluorescencí a koncentrací bakterií je vidět i v případě destičky A. Nevýhodou destičky A je mnohem nižší citlivost (viz obr.19).

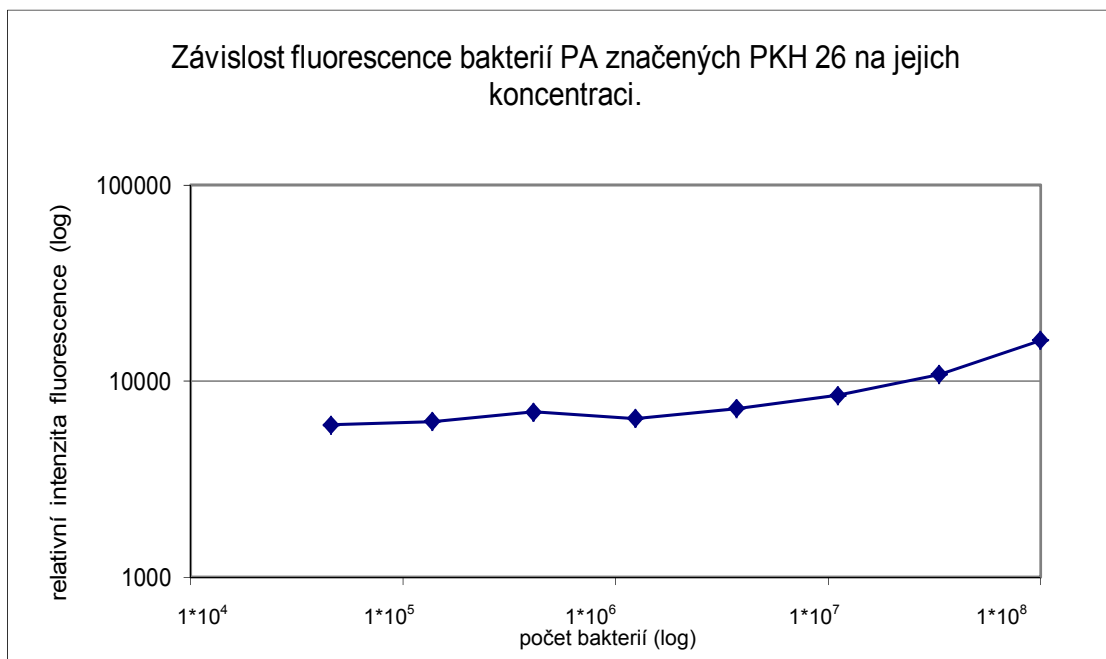


Obr. 18: Grafické znázornění závislosti fluorescence bakterií PA značených pomocí PKH 26 na jejich koncentraci. Základní bakteriální suspenze o koncentraci $1 \cdot 10^8$ b/ml byla ředěna trojkovou řadou. Hodnoty odpovídají destičce B (bílá pro Perkin Elmer, 96 jamek) a jsou získané z přístroje Varioscan Flash 7. Relativní směrodatná odchylka se pohybovala v rozmezí 10-15%.

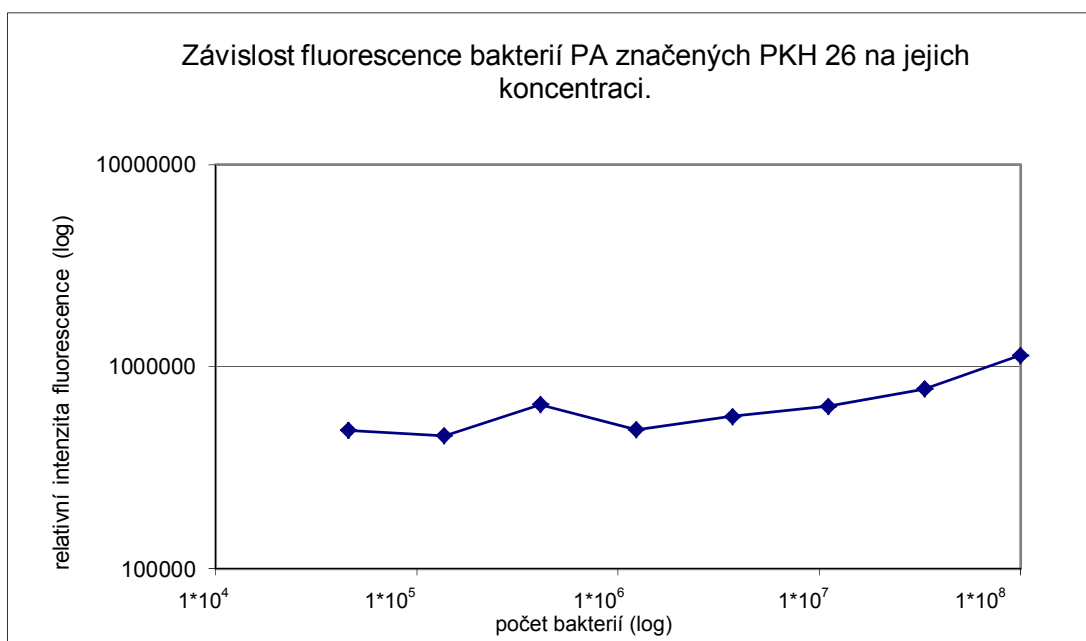


Obr. 19: Grafické znázornění závislosti fluorescence bakterií PA značených pomocí PKH 26 na jejich koncentraci. Základní bakteriální suspenze o koncentraci $1 \cdot 10^8$ b/ml byla ředěna trojkovou řadou. Hodnoty odpovídají destičce A (černá CellBind, 96 jamek) a jsou získané z přístroje Varioscans Flash 7. Relativní směrodatná odchylka se pohybovala v rozmezí 10-15%.

Pro obě destičky (měřené na přístroji Biotek Synergy 2) je patrná obdobná závislost fluorescence na koncentraci bakteriálních buněk (viz obr. 20 a 21). Destička B (viz obr. 21) je však opět několikanásobně citlivější než destička A (viz obr. 20). Bylo zkoušeno několik filtrů, pro oba typy destiček byla nejlepší kombinace excit. 530/25 a emis. 590/35. Relativní směrodatná odchylka byla u těchto měření v rozmezí 10-15%.

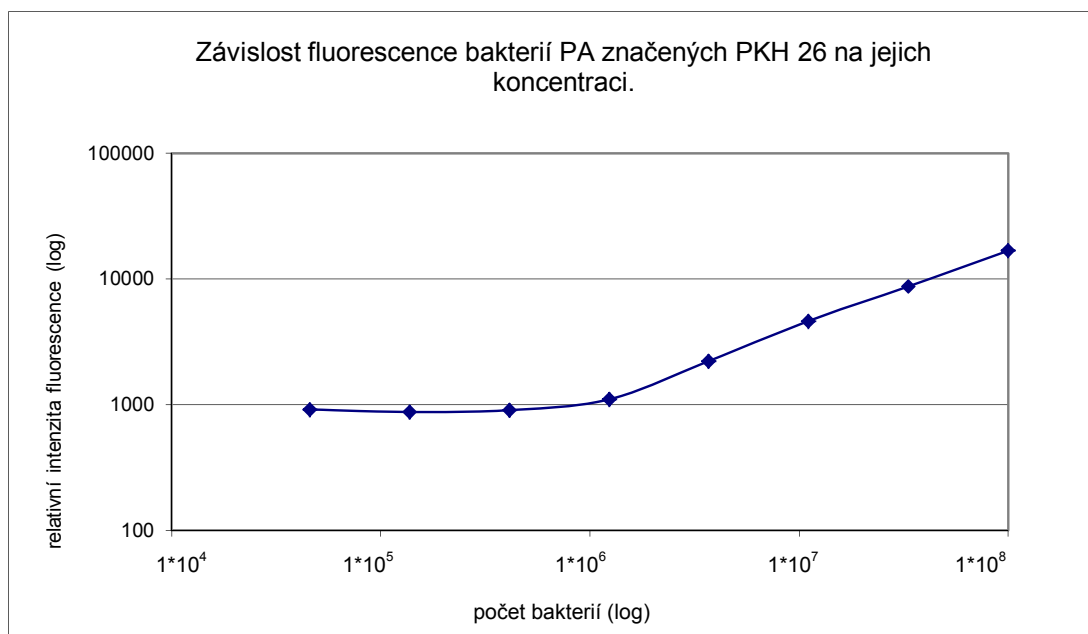


Obr. 20: Grafické znázornění závislosti fluorescence bakterií PA značených pomocí PKH 26 na jejich koncentraci. Základní bakteriální suspenze o koncentraci $1 \cdot 10^8$ b/ml byla ředěna trojkovou řadou. Hodnoty odpovídají destičce A (černá CellBind, 96 jamek) a jsou získané z přístroje Biotek Synergy 2.



Obr. 21: Grafické znázornění závislosti fluorescence bakterií PA značených pomocí PKH 26 na jejich koncentraci. Základní bakteriální suspenze o koncentraci $1 \cdot 10^8$ b/ml byla ředěna trojkovou řadou. Hodnoty odpovídají destičce B ("bílá" pro přístroj Perkin Elmer, 96 jamek) a jsou získané z přístroje Biotek Synergy 2.

Následně byla fluorescence bakterií PA značených pomocí PKH 26 měřena také na spektrofluorimetru Infinite M200 PRO (excitace upravena na 522 nm, emise na 569 nm). Tento pokus byl proveden s ohledem možného využití této barvy pro značení PA při adhezních testech na destičce A (CellBind, 96 jamek), viz obr. 22.



Obr. 22: Grafické znázornění závislosti fluorescence bakterií PA značených pomocí PKH 26 na jejich koncentraci. Základní bakteriální suspenze o koncentraci $1 \cdot 10^8$ b/ml byla ředěna trojkovou řadou. Hodnoty odpovídají destičce A (černá CellBind, 96 jamek) a jsou získané z přístroje Infinite M200 PRO. Relativní směrodatná odchylka byla v rozmezí 9-12%.

4.4. Fluorescenční značení buněk A549

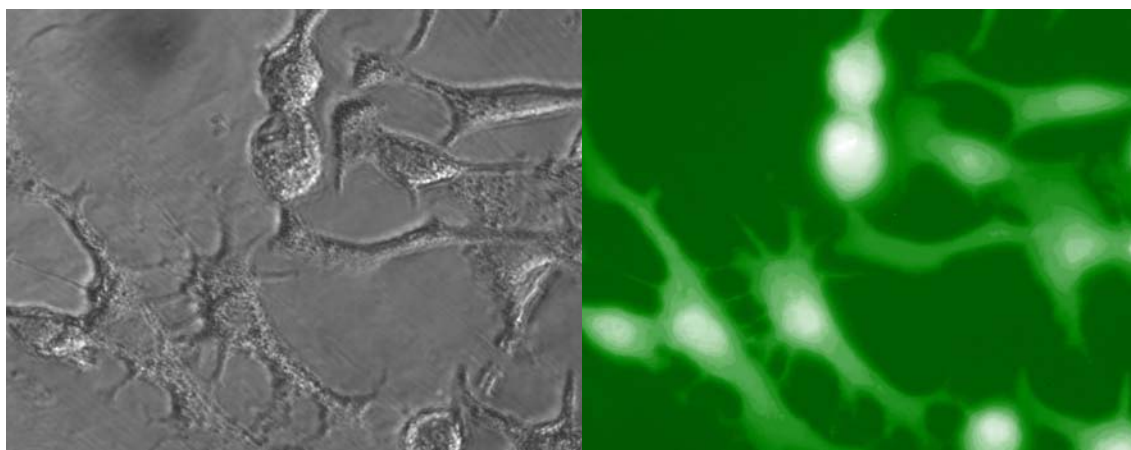
Pro studium adheze bylo potřeba nalézt vhodný způsob značení buněk plicního epitelu. Jako modelový systém byla nejdříve použita linie buněk A549.

4.4.1. Fluorescenční značení buněk A549 pomocí CellTracker

Postup značení touto sloučeninou je popsán v kap. 3.3.6.1. Po úspěšné kultivaci buněk A549 v DMEM mediu na třech různých typech destiček - A (černá CellBind, 96 jamek), B (bílá destička pro fluorimetr Perkin Elmer) a C (Polysorb) bylo přistoupeno k vlastnímu barvení. Zkoušeny byly tři doby inkubace buněk s touto sloučeninou (15, 30 a 45 min.) a dvě koncentrace značící látky (5 a 10 μM). Vyhodnocení bylo provedeno pomocí mikroskopu Nikon-Eclipse (excit. filtr 31001 FITC C87701) přímo na destičkách (viz obr. 23). Z pořízených snímků bylo patrné, že pro označení buněk stačí nižší koncentrace značící látky, tedy 5 μM . V případě vyšší koncentrace byla fluorescence jen nepatrně výraznější. Jako optimální doba inkubace byl shledán čas nejméně 30 min. I po fixaci buněk 10% formaldehydem fluorescence přetrvávala (viz obr. 24).

a)

b)

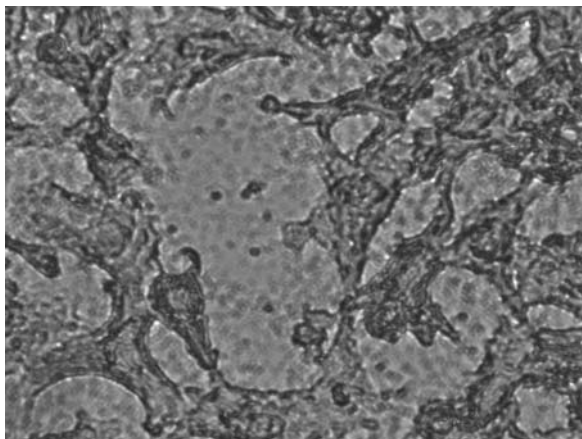


Obr. 23: Výsledek fluorescenčního značení buněk linie A549 barvivem CT. Doba inkubace 30 min., koncentrace barviva 10 μM , destička CellBind (96 jamek).

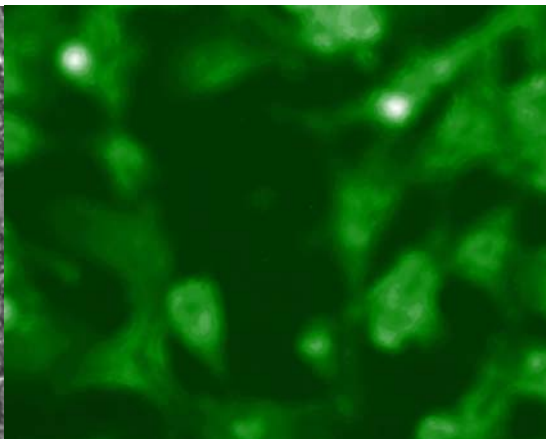
a) záznam z mikroskopu ve viditelné oblasti světla

b) snímek zachycující fluorescenci v téže oblasti preparátu (Nikon, 1500x).

a)



b)



Obr. 24: Buňky linie A549 po fluorescenčním značení barvivem CT a následné fixaci 10% formaldehydem.

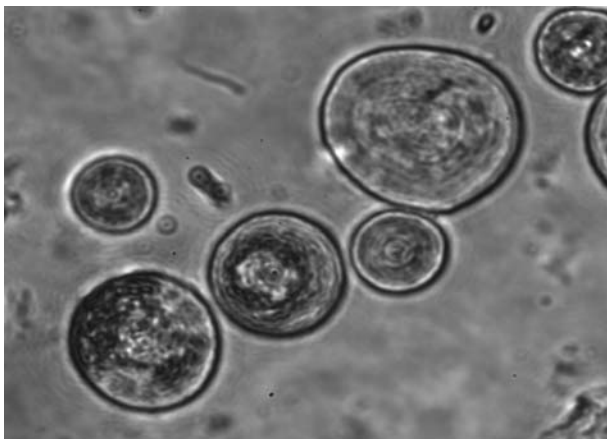
- a) záznam z mikroskopu ve viditelné oblasti světla
- b) snímek zachycující fluorescenci v téže oblasti preparátu (Nikon, 1500x).

4.4.2. Fluorescenční značení buněk A549 pomocí PKH 26

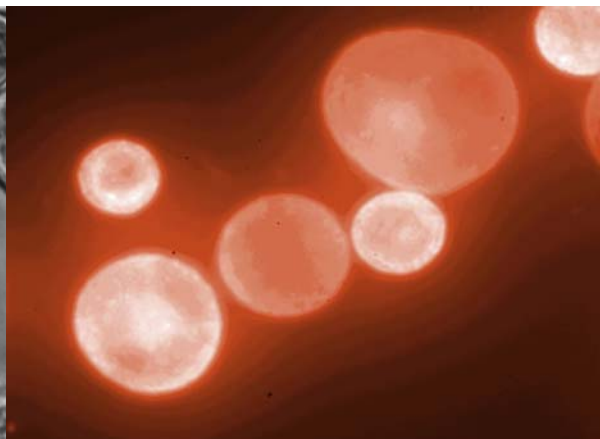
Postup značení touto sloučeninou je podrobněji popsán v kap. 3.3.6.2. Po úspěšné kultivaci buněk A549 v DMEM mediu v kultivační lahvičce a po jejich pasážování následovalo vlastní fluorescenční značení barvivem PKH 26. Na rozdíl od barviva CellTracker, kde se mohou značit i adherované buňky, lze barvení PKH 26 provést jen na buňkách v suspenzi. V našem případě tedy na pasážovaných buňkách. Zkoušeny byly čtyři různé doby inkubace - 2, 5, 10 a 20 min.

Vyhodnocení bylo provedeno pomocí mikroskopu Nikon-Eclipse (filtr 31002 RdiI C87702). Fluorescence buněk byla prokázána u všech čtyř vzorků z různých dob inkubace (2, 5, 10 a 20 min.). Ze získaných dat je zřejmé, že pro označení buněk A549 je dostačující i velmi krátká inkubace s PKH 26, tj. 2 min. (viz obr. 25). Buňky i po označení vykazovaly vysokou viabilitu - přibližně 90%. Po 20 min. inkubaci buněk A549 se značící látkou byla intenzita fluorescence buněk nepatrně nižší a po barvení trypanovou modří zde také bylo vidět méně životaschopných buněk, viabilita takto značených buněk se pohybovala kolem 80%.

a)



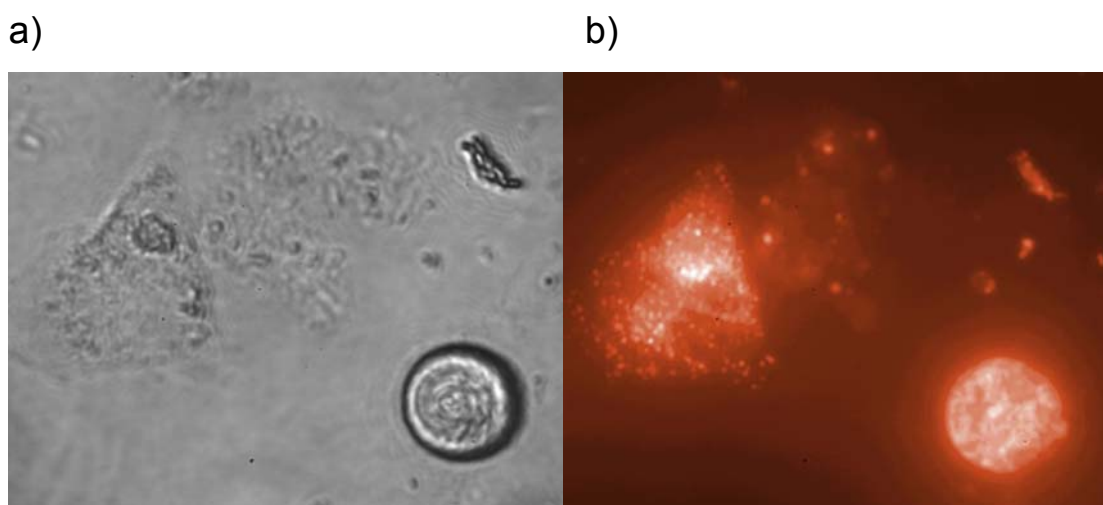
b)



Obr. 25: Buňky linie A549 po fluorescenčním značením barvivem PKH 26. Doba inkubace byla 2 min.

- a) záznam z mikroskopu ve viditelné oblasti světla
- b) snímek zachycující fluorescenci v téže oblasti preparátu (Nikon, 1500x).

Vzhledem k tomu, že barvení PKH 26 lze provést jen na buňkách v suspenzi, v našem případě na pasážovaných buňkách, byla testována také perzistence barviva PKH 26 v buňkách A549. Během kultivace byly označené buňky A549 mikroskopovány přímo na destičce na mikroskopu Nikon-Eclipse (viz obr. 26). Buňky A549 značené pomocí PKH 26 vydržely fluoreskovat téměř měsíc, ale fluorescence postupně tak, jak buňky adherovaly a dělily se, byla pozorována stále s menší intenzitou.

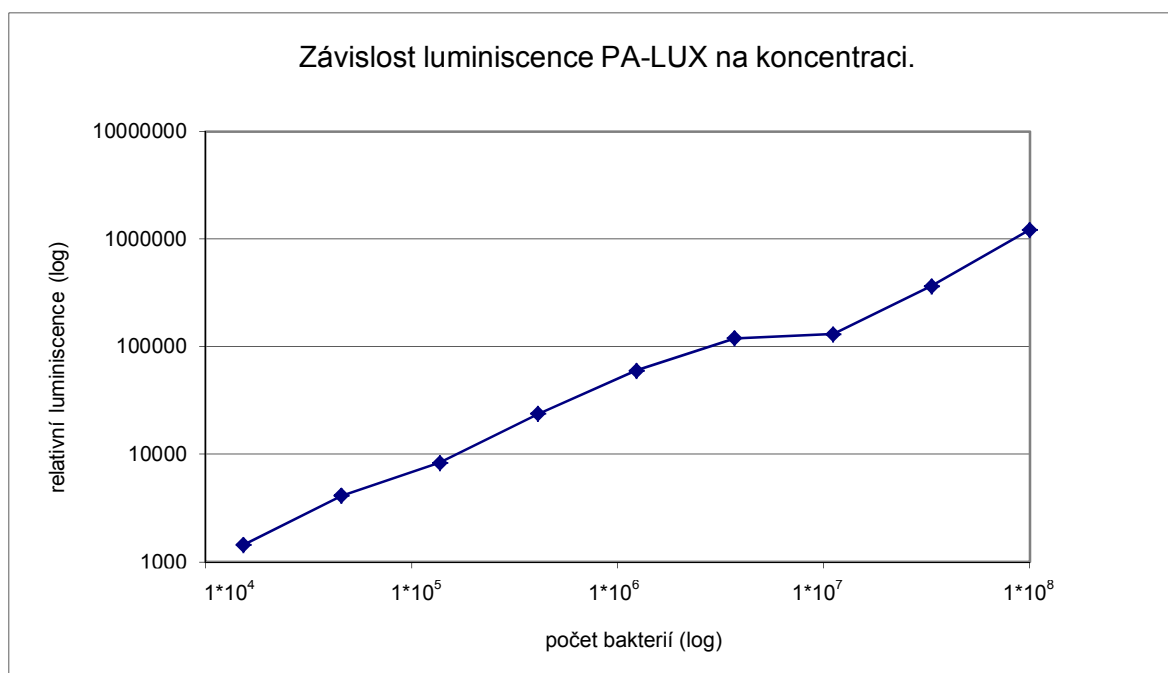


Obr. 26: Buňky A549 po 3 dnech od značení PKH 26. Je zde vidět příklad již adherované, tak i neadherované buňky (kulatý tvar).

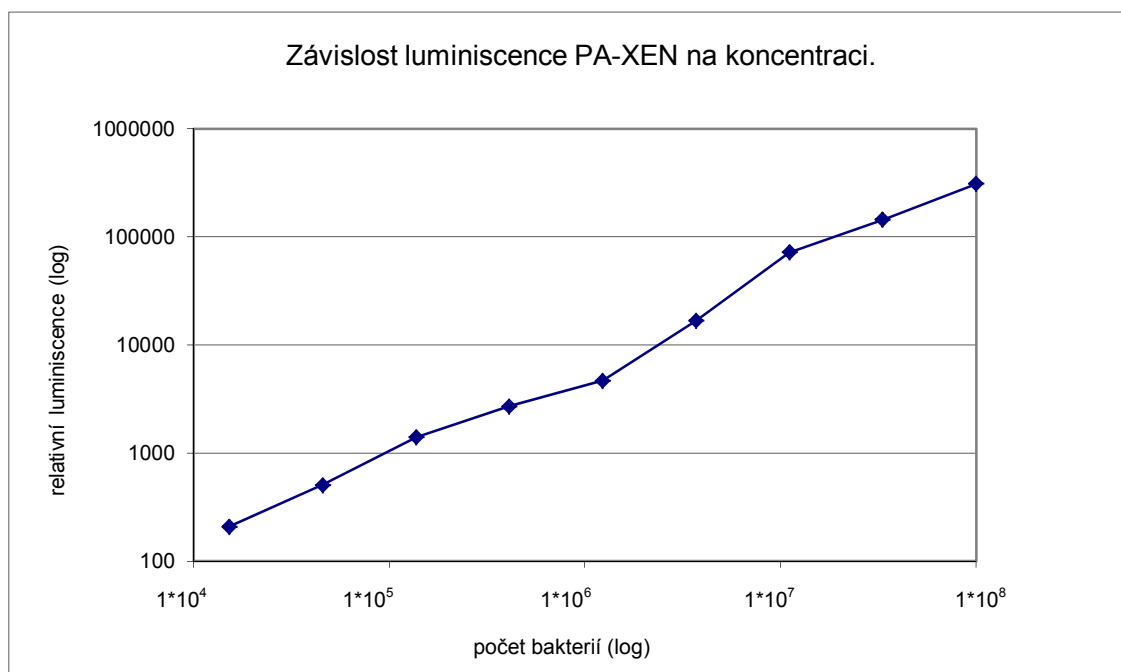
- a) záznam z mikroskopu ve viditelné oblasti světla
- b) snímek zachycující fluorescenci v téže oblasti preparátu (Nikon, 1500x).

4.5. Bioluminiscenční PA

Byly testovány i dva bioluminiscenční kmeny *P. aeruginosa*: PA-LUX a PA-XEN 41. Na agarových plotnách nenarostly. Byly proto zaočkovány do PS média a nechány kultivovat přes noc. Luminiscence nebyla dostatečně intenzivní, aby mohla být v zatemnělé místnosti pozorovatelná pouhým okem. Bylo proto přistoupeno k mikroskopování na mikroskopu Nikon-Eclipse, ale ani s citlivou kamerou Mutech, nebyla pozorována luminiscence o dostatečné intenzitě. Následovalo měření na spektrofluorimetru Infinite M200 PRO, kde již byla zřejmá závislost luminiscence na koncentraci bakterií u obou kmenů (viz obr. 27 a 28).



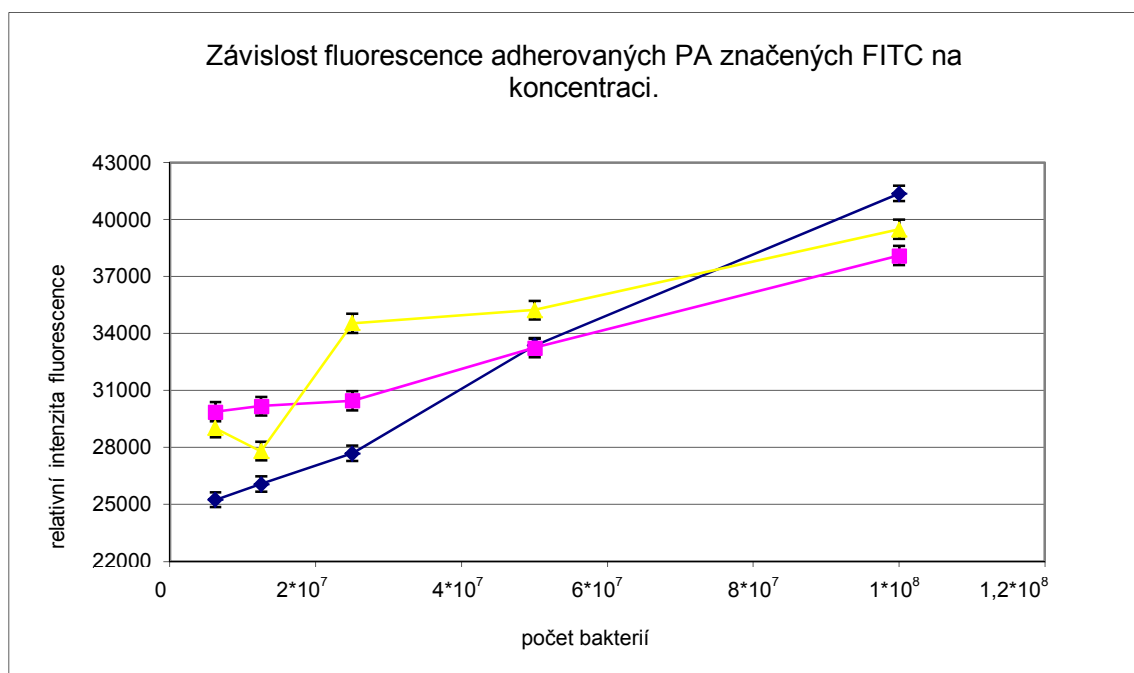
Obr. 27: Grafické znázornění závislosti luminiscence bakterií PA-LUX na jejich koncentraci. Základní bakteriální suspenze o koncentraci $1 \cdot 10^8$ b/ml byla ředěna trojkovou řadou. Hodnoty odpovídají destičce A (černá CellBind, 96 jamek) a jsou získané z přístroje Infinite M200 PRO. Relativní směrodatná odchylka se pohybovala v rozmezí 10-15%.



Obr. 28: Grafické znázornění závislosti luminiscence bakterií PA-XEN 41 na jejich koncentraci. Základní bakteriální suspenze o koncentraci $1 \cdot 10^8$ b/ml byla ředěna trojkovou řadou. Hodnoty odpovídají destičce A (černá CellBind, 96 jamek) a jsou získané z přístroje Infinite M200 PRO. Relativní směrodatná odchylka se pohybovala v rozmezí 10-13%.

4.6. Adhezní testy

Adhezní testy byly nejprve provedeny dle postupu v práci [50], kde byla sledována adheze bakterií PA značených pomocí FITC na buňky linie A549. Takovéto uspořádání adhezních testů bylo v našem případě provedeno dvakrát, rozdíl mezi těmito dvěma testy adheze spočíval jen v různé koncentraci použité L-fukosy (0,2 mg/ml nebo 1 mg/ml). Výsledky získané z těchto měření jsou zobrazeny na obr. 29 a obr. 30. Poté byla zkoušena i varianta se značenými jak bakteriemi PA, tak buňkami A549. Bakterie PA byly, jak již bylo řečeno, barveny pomocí FITC (poskytující fluorescence v zelené oblasti spektra) a hledala se tak možnost značení buněk A549 tak, aby se obě fluorescence vzájemně nepřekrývaly. Buňky linie A549 tak byly barveny pomocí PKH 26 (fluorescence v červené oblasti spektra).



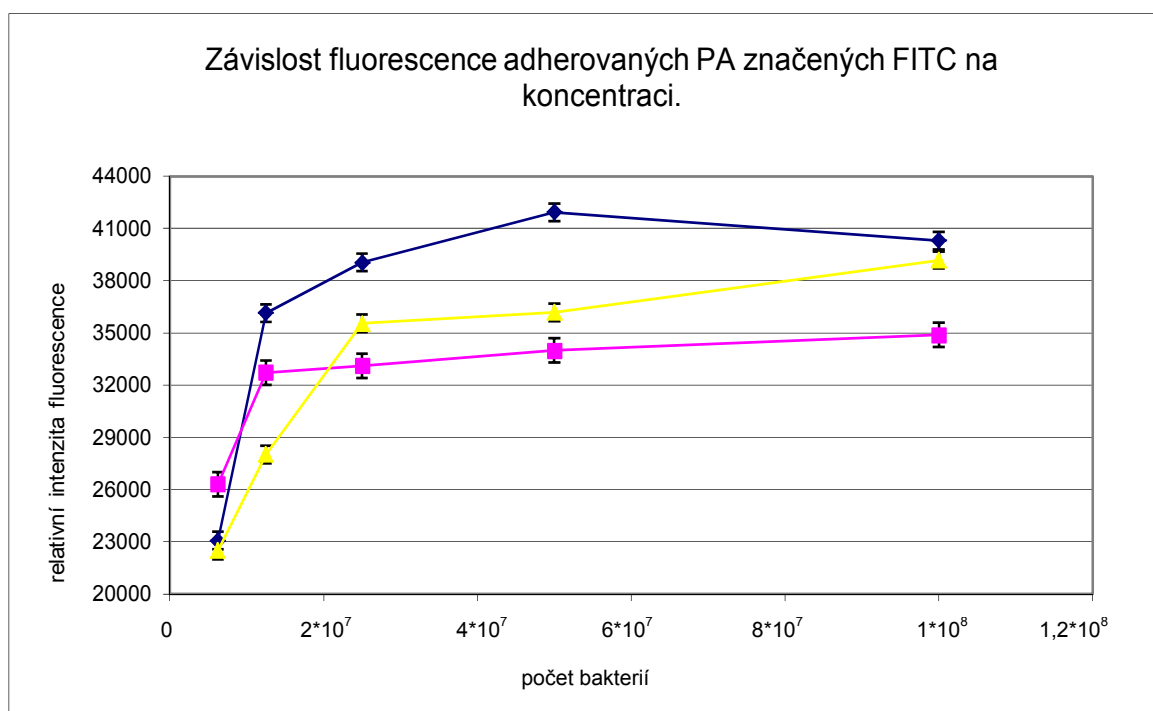
Obr. 29: Vyhodnocení adhezních testů. Základní bakteriální suspenze o koncentraci $1 \cdot 10^8$ b/ml byla ředěna dvojkovou řadou. Hodnoty jsou získané z přístroje Infinite M200 PRO.

(-♦-) odpovídá fluorescenci neovlivněných bakterií PA

(-■-) odpovídá fluorescenci bakterií PA inkubovaných s L-fukosou (0,2 mg/ml)

(-▲-) odpovídá fluorescenci bakterií PA inkubovaných se specifickou slepičí protilátkou (100 µg/ml).

Pro studium možného ovlivnění adheze bakterií PA na buňky plicního epitelu byl využit sacharid L-fukosa, který je potenciálním blokátorem vazného místa bakteriálního lektinu PA-IIL a specifická slepičí protilátka proti tomuto lektinu.



Obr. 30: Vyhodnocení adhezních testů. Základní bakteriální suspenze o koncentraci $1 \cdot 10^8$ b/ml byla ředěna dvojkovou řadou. Hodnoty jsou získané z přístroje Infinite M200 PRO.

- (-♦-) odpovídá fluorescenci neovlivněných bakterií PA
- (-■-) odpovídá fluorescenci bakterií PA inkubovaných s L-fukosou (1 mg/ml)
- (-▲-) odpovídá fluorescenci bakterií PA inkubovaných se specifickou slepičí protilátkou (100 µg/ml).

5. Diskuse

Cystická fibróza (CF) je geneticky podmíněné onemocnění způsobené mutací genu produkujícího protein CFTR. Protein CFTR slouží především jako kanál pro transport chloridových iontů. Defekt v tomto proteinu s sebou přináší celou řadu zdravotních komplikací. Nejzávažnější je postižení dýchací soustavy. Pacienti s CF trpí častými mikrobiálními infekcemi plic, které vedou k rozvoji chronického zánětu a postupné destrukci plicní tkáně. Typickými mikroorganismy kolonizujícími dýchací cesty pacientů s CF jsou *Pseudomonas aeruginosa* a *Burkholderia cepacia*. V současnosti je nejpoužívanější terapií v boji s těmito infekcemi léčba antibiotiky. Ta je však komplikována vznikem rezistencí. Proto jsou hledány nové možnosti léčby a jednou z nich je právě využití pasivní imunizace. Z tohoto důvodu se také tato práce zabývá vývojem vhodného modelového systému pro studium adheze těchto mikroorganismů na buňky plicního epitelu a možností ovlivnění této adheze pomocí specifických slepičích protilátek jako agens pasivní imunizace.

Naší snahou bylo vytvořit modelový systém simulující reálnou situaci adheze bakterií PA na plicní epitel pacientů s CF. Protože se buňky pacientů s CF odlišují od buněk zdravých jedinců - na povrchu epiteliálních buněk pacientů s CF dochází ke změnám v glykosylaci [55], byla hledána vhodná metoda izolace buněk plicního epitelu pacientů s CF nepoškozující jejich povrchové struktury. A následně byla také optimalizována kultivace těchto epiteliálních buněk.

Izolace plicních epiteliálních buněk přímo z plicní tkáně je invazivní metoda, při níž dochází k poškození důležitých povrchových struktur buněk. Byl proto hledán šetrnější způsob získávání buněk plicního epitelu pacientů s CF. Touto šetrnější metodou je tzv. „brushing“ [56], kdy jsou buňky získány od pacientů s CF při bronchoskopickém vyšetření pomocí speciálního kartáčku, na který se buňky zachytí. Úskalím této techniky je aplikace lokálního anestetika, protože získané plicní epiteliální buňky mohou být použitým lokálním anestetikem ovlivněny. Například použití lidokainu jako lokálního anestetika významně snižuje viabilitu získaných buněk [56]. To se projevilo i v našem případě, kdy u některých vzorků byl jako lokální anestetikum využito mezokain.

Jako nejvhodnější kultivační medium pro buňky plicního epitelu získané metodou “brushing” se ukázalo LHC-9 medium, které obsahuje důležité růstové faktory (např. EGF- Epidermal growth factor). V tomto mediu určeném pro kultivaci plicních buněk vykazovaly získané buňky lepší adhezenci, růst byl však i v tomto mediu velmi pomalý. Další komplikací během kultivací buněk plicního epitelu byly časté kontaminace. Ve vzorcích od pacientů s CF byly kromě buněk často přítomny také bakterie či spory různých mikroorganismů typických pro CF pacienty (*Aspergillus*, *Candida*). Do kultivačního LHC-9 media byla proto přidávána i antibiotika. I přes použití antibiotik se však u některých vzorků kontaminace zvládnout nepodařila.

Kromě kultivací ve speciálních kultivačních lahvičkách, byly testovány také kultivační lahvičky potažené různými povrchy – kolagen typ I , fibronectin, poly-L-lysin, L-lysin a želatina. Jako nejvhodnější se však zdá být kultivace primárních epiteliálních buněk v kultivační lahvičce bez modifikace povrchu, jak prokázala úspěšná kultivace primárních epiteliálních buněk u Hu 1.

Zkoušeny byly také různé doby kultivací primárních epiteliálních buněk. U buněk kultivovaných po dobu 3 týdnů, byla patrná tvorba souvislé vrstvy buněk adherovaných na povrch.

Nevýhodou je, že pokud jsou již primární epiteliální buňky adherované na povrch kultivační lahvičky, nelze je již pomocí mikroskopu Nikon-Eclipse téměř pozorovat.

Pro studium adheze bakterií PA bylo potřeba získat souvislou vrstvu buněk na povrchu jamek destičky A (černá CellBind, 96 jamek). Tato destička s průhledným dnem byla zvolena proto, že na ni lze sledovat mikroskopicky průběh pokusu. Kontrola pomocí mikroskopu je důležitá jak během kultivace epiteliálních buněk, tak během adhezních testů. Při pokusu je mono vrstva buněk převrstvena bakteriemi PA a tato směs inkubována. Po inkubaci jsou odstraněny neadherované bakterie PA a je sledováno množství adherovaných bakterií PA na povrch epiteliálních buněk.

Pro objektivní vyhodnocení adhezních testů bylo přistoupeno k fluorescenčnímu značení jednotlivých komponent modelového systému – bakterií *Pseudomonas aeruginosa* (PA) a buněk plicního epitelu. Pro optimalizaci metody byly využity epiteliální buňky linie A549.

Nejdříve bylo hledáno vhodné fluorescenční barvivo pro značení bakterií PA. Pro použití značených bakterií PA v adhezních testech bylo potřeba získat bakterie, které jednoznačně vykazují fluorescenci, zároveň zůstávají po označení životaschopné a jejich povrchové struktury jsou co nejméně modifikované

Nejprve bylo zkoušeno značení bakterií PA pomocí barviva CellTracker Green CMFDA (CT), které ovšem značilo bakterie PA nedostatečně a fluorescence měla jen malou intenzitu. Ani když byl modifikován protokol tak, aby byl za usnadnění vstup barviva CT do bakteriální buňky, nebylo dosaženo dostatečné fluorescence bakterií PA. Proto bylo barvivo CT vyhodnoceno jako nevhodné a nebylo dále pro barvení bakterií PA využíváno.

Následně bylo zkoušeno značení bakterií PA pomocí resazurinu. Resazurin nefluoreskuje sám o sobě, ale je pomocí bakteriálních reduktas přeměněn na fluoreskující resorufin. Touto sloučeninou lze také detekovat viabilitu bakteriálních buněk, neboť pouze živé bakterie přeměňují resazurin na fluoreskující resorufin [49]. Značení bakterií PA touto sloučeninou bylo úspěšné. Bakterie PA vykazovaly fluorescenci o dostatečné intenzitě a zůstaly i po označení životaschopné. Problémem však bylo, že označené bakterie PA tuto sloučeninu uvolňovaly. V případě přenesení značených bakterií PA do media nebo do PBS byl tento jev poměrně slabý a barvivo bylo uvolňováno jen v malém množství. Výrazný byl tento jev při přenesení takto značených bakterií PA do vody (hypotonické prostředí), kdy bylo barvivo uvolněno téměř všechno. S tímto barvivem byla provedena i spektrofotometrická měření, kde byla pozorována korelace mezi fluorescencí a koncentrací bakterií PA značených pomocí resazurinu. Pro značení bakterií PA je tedy použití resazurinu možné. Nevýhodou je však uvolňování tohoto barviva ze značených bakterií PA, což znesnadňuje jejich přesnou kvantifikaci.

Dále bylo vyzkoušeno značení bakterií PA pomocí FITC. Testovány byly tři možné způsoby značení bakterií PA touto sloučeninou. Fluorescence byla pozorována ve všech případech, ale ne vždy v dostatečném odstupu od pozadí. S touto sloučeninou byla provedena i spektrofotometrická měření, kde byla pozorována jasná korelace mezi fluorescencí a koncentrací bakterií PA značených pomocí FITC. Tato sloučenina byla použita i v práci [50] ke značení PA v adhezních testech.

Protože se v našich experimentech ukázalo, že barvivo FITC sice bakterie PA označí, ale současně modifikuje jejich povrchové struktury, což pro adhezní testy

není žádoucí, bylo vyzkoušeno také značení bakterií PA pomocí PKH 26. Značení bakterií PA touto sloučeninou bylo úspěšné. Bakterie PA vykazovaly po označení jasnou fluorescenci a byly životaschopné. Úspěšné značení bakterií PA pomocí této sloučeniny je popsáno i v [57]. Pro spektrofotometrická měření bakterií PA značených pomocí PKH 26 bylo nutné využít spektrofotometrů s malým spektrálním intervalem, neboť hodnoty excitačního a emisního maxima PKH 26 jsou blízko u sebe (excitační maximum: 551 nm, emisní maximum: 567 nm). Spektrofotometrická měření tak byla v tomto případě zkoušena na různých typech přístrojů (Perkin Elmer L 55, Varioscan Flash V7, Biotek Synergy 2 a Infinite M200 PRO). Byla také testována spektrofotometrická měření na různých typech destiček (A – černá CellBind, 96 jamek; B – bílá pro Perkin Elmer, 96 jamek; C – Polysorb, 96 jamek). Z hlediska citlivosti byla jako nejlepší vyhodnocena destička B. Její nevýhodou je neprůhledné dno, nelze tedy sledovat povrch jamek mikroskopicky, což je v případě adhezních testů důležité.

Pokroky v molekulární biologii umožnily klonování a expresi genů klíčových pro luminiscenci v bakteriích, které jsou normálně neluminiscenční [58]. Existují již speciálně geneticky modifikované kmeny bakterií PA, které vykazují bioluminiscenci a mají tedy tu výhodu, že se již nemusí značit.

V našem případě byly zkoušeny dva kmeny bioluminiscenčních PA: PA-LUX a PA-XEN. Pomocí citlivé kamery mikroskopu Nikon-Eclipse nebyla jejich luminiscence pozorovatelná. Až s použitím přístroje Infinite M200 PRO, na kterém byla provedena luminiscenční měření, již oba tyto kmeny vykazovaly jasnou luminiscenci a byla zde patrná korelace mezi luminiscencí a koncentrací těchto bakterií. Tyto luminiscenční kmeny PA jsou detekovatelné při počtu 10^4 bakterií v jamce, kdežto fluorescenčně značené PA jsou detekovatelné přibližně od počtu 10^6 bakterií na jamku. V tomto ohledu je tedy využití luminiscenčních PA výhodnější. Ale vzhledem k tomu, že jsou tyto bioluminiscenční kmeny PA více modifikované než PA značené pomocí PKH 26, není jejich využití v adhezních testech vhodné. Naší snahou je, aby byly PA pokud možno co nejméně modifikované, protože v plánu jsou izolace PA od různých pacientů s CF a výroba terapeutického prostředku vždy pro každého pacienta individuálně.

Pro studium adheze bakterií *P. aeruginosa* na buňky plicního epitelu bylo potřeba získat fluorescenčně značené jak bakterie *P. aeruginosa*, tak buňky plicního epitelu.

Pro nalezení vhodného barviva a optimálního protokolu barvení byly využity epiteliální buňky linie A549. Buňky linie A549 byly značeny pomocí sloučeniny CellTracker Green CMFDA (CT). Barvení bylo úspěšné a buňky vykazovaly jasnou fluorescenci a byly životaschopné. Bylo ověřeno, zda buňky fluoreskují i po fixaci 10% formaldehydem a výsledek byl též kladný.

Zkoušeno bylo také barvení buněk linie A549 pomocí sloučeniny PKH 26. I zde bylo barvení úspěšné a buňky vykazovaly fluorescenci i viabilitu. Vzhledem k tomu, že barvení PKH 26 lze provést jen na buňkách v suspenzi, byla testována také perzistence barviva PKH 26 v buňkách A549. Označené buňky linie A549 byly mikroskopovány během kultivace přímo na destičce. Buňky vykazovaly fluorescenci téměř měsíc, ale fluorescence postupně tak, jak buňky adherovaly na povrch jamek a dělily se, byla pozorována stále s menší intenzitou.

Ve vlastních adhezních testech s bakteriemi PA barvenými pomocí FITC (podle postupu v práci [50]) bylo zkoumáno ovlivnění adheze bakterií PA na buňky plicního epitelu pomocí L-fukosy a specifické slepičí protilátky. Tyto adhezní testy byly provedeny dvakrát, lišily se v koncentraci použité L-fukosy (0,2 mg/ml nebo 1 mg/ml). V prvním případě byly buňky linie A549 kultivovány příliš dlouho dobu a po provedení adhezních testů a následném nabarvení pomocí barviva Giemsa bylo na mikroskopu viditelné, že se buňky již na některých místech jamek uvolňovaly a nebylo tak docíleno souvislé vrstvy buněk. Tím je možno vysvětlit rozdílné výsledky získané z těchto téměř totožných experimentů.

Poté byla zkoušena i varianta jak se značenými bakteriemi PA pomocí FITC, poskytující fluorescenci v zelené oblasti spektra, tak se značenými buňkami A549 pomocí PKH 26, poskytující fluorescenci v červené oblasti spektra. Vliv L-fukosy a zejména specifické slepičí protilátky na adhezi PA na buňky linie A549 však nebyl pozorován. Bylo proto pátráno dál, proč tento experiment přináší data, která nekorelují s naší hypotézou. Byla sledována viabilita značených bakterií PA pomocí FITC a z vyhodnocení růstové křivky bylo zjištěno, že za přírůstek optické denzity jsou odpovědné bakteriální buňky, které jsou životaschopné, ale nevykazují fluorescenci. Naopak odumřelé bakteriální buňky fluorescenci vykazovaly. Vzhledem k faktu, že fluorescenci vykazují bakterie, které nejsou životaschopné, není FITC pro adhezní testy vhodnou sloučeninou.

Přestože je FITC velmi často využíván ke značení bakterií, sice značí bakterie PA, ale ty již nejsou po značení životaschopné. Povrch takto značených bakterií je velmi modifikován a to jistě ovlivní i průběh adhezních testů. Nabízí se zde tedy možnost využití PA barvených pomocí PKH 26, kde vzhledem k mechanismu značení nedochází k modifikaci povrchu bakterií, a buněk plicního epitelu pomocí CellTracker Green CMFDA. Fluorescence těchto dvou sloučenin by se neměly navzájem překrývat a jejich využití v adhezních testech je proto vhodné. Dalším krokem bude tedy provedení adhezních testů v tomto systému a nejlépe již s primárními buňkami získanými ze vzorků od pacientů s CF pomocí „brushingu“.

Závěrem je tedy možno shrnout, že byl nalezen vhodný modelový systém pro objektivní vyhodnocení adhezních testů – buňky plicního epitelu značené pomocí CellTracker Green CMFDA a bakterie PA značené pomocí PKH 26. Metodika adhezního testu byla optimalizována s využitím bakterií PA značených pomocí FITC a epiteliálních buněk značených pomocí PKH 26. V těchto pilotních experimentech byly použity epiteliální buňky linie A549. Protože jsou již k dispozici optimalizované metody izolace a kultivace buněk plicního epitelu CF pacientů, následující experimenty budou již provedeny s takto získanými buňkami přímo od CF pacientů.

6. Souhrn

- Byla optimalizována izolace a kultivace buněk plicního epitelu pacientů s CF.
- Byly úspěšně fluorescenčně označeny bakterie *P. aeruginosa* pomocí sloučeniny PKH 26, která zachovává viabilitu bakterií.
- Byly úspěšně fluorescenčně označeny plicní epiteliální buňky pomocí sloučeniny CellTracker Green CMFDA i pomocí PKH 26. V obou případech byla zachována viabilita buněk.
- Byla studována možnost ovlivnění adheze bakterií *P. aeruginosa* na buňky plicního epitelu pomocí L- fukosy, která je potenciálním blokátorem vazného místa bakteriálního lektinu PA-IIL a pomocí specifické slepičí protilátky proti lektinu PA-IIL.

7. Seznam použité literatury

1. Vávrová, V. a kol.: Cystická fibróza, Grada Publishing, a.s., Praha (2006)
2. <http://www.wikiskripta.eu>, staženo dne 15.3. 2012
3. <http://users.ox.ac.uk/~genemed/cysticfibrosis/function.html>,
staženo dne 15.3. 2012
4. Pier, G.B., Grout, M., Zaidi, T.S.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 12088-12093 (1997)
5. <http://transmed-cf.wikispaces.com/2.1.1+The+CF+Genotype>,
staženo dne 15.3. 2012
6. Kerem, B., Rommens, J.M., Buchanan, J.A., Markiewicz, D., Cox, T.K.,
Chakravarti, A., Buchwald, M., Tsui, L.C.: Science 245, 1078-1080 (1989)
7. Vávrová, V. a kol.: Cystická fibróza v praxi, Kreace s.r.o., Praha (1999)
8. Rosenstein, B.J., Cutting, G.R.: J. Pediatr. 132, 589-595 (1998)
9. Gibson, L.E., Cooke, R.E.: Pediatrics 23, 545-549 (1959)
10. Desmarquest, P., Feldmann, D., Tamalat, A., Boule, M., Fauroux, B., Tournier, G., Clement, A.: Chest 118, 1591-1597 (2000)
11. Skalická, V., Fila, L., Zemková, D., Smolíková, L., Vávrová, V.: Postgraduální medicína 7, 817-824 (2010)
12. Balaščíková, M., Piskáčková, T., Holubová, A.: Čes-slov. Pediatr. 2, 62–75 (2008)
13. Castellani, C., Southern, K.W., Brownlee K. a kol.: J. Cyst. Fibros. 8, 153-173 (2009)
14. Balaščíková, M., Holubová, A., Skalická, V., Zemková, D., Kračmar, P.,
Gonsorčíková, L., Čamajová, J., Piskáčková, T., Lebl, J., Dřevínek, P., Gregor, V., Vávrová, V., Votava, F., Macek, M.Jr.: J. Cyst. Fibrosis 8, 224-227 (2009)
15. Chaparro, C., Maurer, J., Gutierrez, C.: Am. J. Respir. Crit. Care Med. 163, 43-48 (2001)
16. <http://cs.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas>, staženo dne 15.4. 2012
17. <http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>, staženo dne 15.4. 2012
18. Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., Ciofu, O.: Int. J. Antimicrob. Agents. 35, 322-332 (2010)
19. FitzSimmons, S.C.: J. Pediatr. 122, 1-9 (1993)

20. Kerem, E., Corey, M., Gold, R., Levison, H.: J. Pediatr. 116, 714-719 (1990)
21. Nixon, G.M., Armstrong, D.S., Carzino, R., Carlin, J.B., Olinsky A., Robertson, C.F., Grimwood, K.: J. Pediatr. 138, 699-704 (2001)
22. Høiby, N., Pedersen, S.S., Jensen, E.T., Pressler, T., Shand, G.H., Kharazmi, A., Döring, G.: Acta Univ Carol Med 36, 16-21 (1990)
23. Prince, A.: Microb. Pathog. 13, 251-260 (1992)
24. Sajjan, U., Reisman, J., Doig, P., Irvin, R.T., Forstner, G., Forstner, J.: J. Clin. Invest. 89, 657-665 (1992)
25. <http://www.burkholderia.com/>, staženo dne 15.2. 2012
26. <http://microblog.me.uk/268>, staženo dne 15.2. 2012
27. Aucoin, D.P., Crump, R.B., Thordkildson, P., Nuti, D.E., LiPuma, J.J., Kozel, T.R.: J. Med. Microbiol. 59, 41-47 (2010)
28. Coenye, T., Vandamme, P.: Environ. Microbiol. 5, 719-729 (2003)
29. Isles, A., Maclusky, I., Corey, M., Gold, R., Prober, C., Fleming, P., Levison, H.: J. Pediatr. 104, 206-210 (1984)
30. Martin, D.W., Mohr, C.D.: Infect. Immun. 68, 24-29 (2000)
31. Sist, P., Cescutti, P., Skerlavaj, S., Urbani, R., Leitao, J.H., Sá-Correia, I., Rizzo, R.: Carbohydr. Res. 338, 1861-1867 (2003)
32. Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček, A., Vávra, J. a kol.: Lékařská mikrobiologie (bakteriologie, virologie, parazitologie), Marvil, Praha (1996)
33. Cachia, P. J., Hodges, R. S.: Biopolymers 71, 141-168 (2003)
34. Cryz, S.J., Jr., Furer, E., Que, J.U.: Infect. Immun. 59, 45-50 (1991)
35. Kollberg, H., Carlander, D., Olesen, H., Wejåker, P. E., Johannesson, M., Larsson, A.: Pediatr. Pulmonol. 35, 433-440 (2003)
36. Nilsson, E., Kollberg, H., Johannesson, M., Wejåker, P.E., Carlander, D., Larsson, A.: J. Med. Food 10, 375-378 (2007)
37. Nilsson, E., Larsson, A., Olesen, H.V., Wejåker, P.E., Kollberg, H.: Pediatr. Pulmonol. 43, 892-899 (2008)
38. Hořejší, V., Bartůňková, J. a kol.: Základy imunologie, Triton, Praha (1998)
39. Goldsby, R. A., Kindt, T. J., Osborne, B. A.: Kuby Immunology, W. H. Freeman and Company (2000)
40. Bals, R., Weiner, D.J., Wilson, J.M.: J. Clin. Invest. 103, 303-307 (1999)
41. Akademický bulletin 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze 8 (1999)

42. Sofrová, D., Tichá, M., Barthová, J., Entlicher, G., Stiborová, M., Novák, F., Hudeček, J., Hladík, J., Krajhanzl, A.: Biochemie – Základní kurz, Karolinum, Praha (2005)
43. Ruan, G., Ma, L., Meng, X., Meng, M., Wang, X., Lin, Y., Wu, Z., He, X., Wang J., Zhu, Y.: J. Immunoassay Immunochem 28, 35-45 (2007)
44. Ntakarutimana, V., Demedts, P., van Sande, M., Sharpé, S.: J. Immunol. Methods 153, 133-140 (1992)
45. Kovacs-Nolan, J., Philips, M., Mine, Y.: J. Agric. Food Chem. 53, 8421-8431 (2005)
46. Strober, W.: Curr Protoc Immunol. Appendix 3, Appendix 3B (2001)
47. Scharfman, A., Kroczyński, H., Carnoy, C., Van Brusel, E., Lamblin, G., Ramphal, R., Roussel, P.: Infect. Immun. 64, 5417-5420 (1996)
48. Wong, M., Chu, W., Sun, D., Huang, H., Chen, J., Tsai, P., Lin, N., Yu, M., Hsu, S., Wang, S., Chang, H.: Appl. Environ. Microbiol 72, 6111-6116 (2006)
49. Vidal-Aroca, F., Meng, A., Minz, T., Page, M.G.P., Dreier, J. : J. Microbiol. Methods 79, 232-237 (2009)
50. Hammes, D.: Adhäsion sequentieller Bakterienisolate von Mukoviszidosepatienten mit chronischer *Pseudomonas aeruginosa*-Infektion unter Berücksichtigung der Lungenfunktion, Disertační práce Universität Düsseldorf (2007)
51. <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/C2925>, staženo dne 10.2. 2012
52. West, S.E., Zeng, L., Lee, B.L., Kosorok, M.R., Laxova, A., Rock, M.J., Splaingard, M.J., Farrell, P.M.: JAMA 287, 2958-2967 (2002)
53. Warr, G.W., Magor, K.E., Higgins, D.A.: Immunol. Today 16, 392-398 (1995)
54. Li, X., Nakano, T., Sunwoo, H.H., Paek, B.H., Chae, H.S., Sim, J.S.: Poult. Sci. 77, 266-270 (1998)
55. Döring, G.: Eur. Respir. Mon. 35, 1-20 (2006)
56. Kelsen, S. G., Mardini I. A., Zhou, S., Benovic, J. L., Higgins, N. C.: Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 7, 66-72 (1992)
57. Kierbel, A., Gassama-Diagne, A., Rocha, C., Radoshevich, L., Olson, J., Mostov, K., Engel, J.: J. Cell Biol. 177, 21-27 (2007)
58. Hill, P. J., Rees, C. E. D., Winson, M. K, Stewart G. S. A. B.: Biotechnol. Appl. Biochem. 17, 3-14 (1993)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka